

Morphometrische Untersuchung
der Feinstrukturen der Zellmembran
von Jejunumepithelzellen bei Zöliakie
im Kindesalter

Detlef Kohl

*Ass
München
1986*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554610_0033

Aus dem Institut für Klinische Chemie am Klinikum Großhadern
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. M. Knedel

Morphometrische Untersuchung der Feinstrukturen der Zellmembran
von Jejunumepithelzellen bei Zöliakie im Kindesalter

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Detlef Kohl

aus
Amberg

München 1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. A. Fateh-Moghadam

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. M. Knedel

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: **25.3.86**

Die experimentellen Arbeiten zu vorliegender Dissertation wurden von September 1981 bis Oktober 1983 am Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie und am Lehrstuhl für Technische Chemie I der Technischen Universität München durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. A. Fateh-Moghadam und Herrn Prof. Dr. Dr. A. Bacher danke ich sehr herzlich für die intensive Förderung dieser Arbeit, die engagierte Einführung in wissenschaftliches Arbeiten, die wertvollen Anregungen und die immer gewährte großzügige Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. L. Bachmann und seinen Mitarbeitern für die Einführung in die Elektronenmikroskopie und die dabei geleisteten wertvollen Hilfestellungen.

Herzlich danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. A. Ashkenazi, Dept. of Pediatrics, Kaplan Hospital, Rehovot, Israel, der die Mukosabiopsien zur Verfügung stellte und die klinischen Untersuchungen vornahm.

Für die Anfertigung der rasterelektronenmikroskopischen Arbeiten bin ich Herrn Prof. Dr. Y. Ben-Shaul, G. S. Wise Life Sciences Center, Tel Aviv University, Israel zu großem Dank verpflichtet.

Herrn Dr. rer. nat. P. Nielsen möchte ich für seine freundschaftliche Unterstützung bei der Anfertigung der Computerprogramme hiermit nochmals herzlich danken.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für organische Chemie und Biochemie in Garching für ihre stets freundliche Unterstützung.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Abkürzungen	
Tabellenverzeichnis	
<u>1. EINLEITUNG</u>	1
1.1 DEFINITION, HÄUFIGKEIT UND VERBREITUNG DER ZÖLIAKIE	1
1.2 KLINIK	
1.2.1 Symptomatik und Pathophysiologie	2
1.2.2 Diagnostik	3
1.2.2.1 Dünndarmbiopsie	3
1.2.2.2 Gewebekulturverfahren	4
1.2.2.3 Labordiagnostik	4
1.2.3 Therapie	6
1.2.4 Prognose	7
1.3 MORPHOLOGIE DES DÜNNDARMEPITHEL	7
1.3.1 Lupenmikroskopie	7
1.3.2 Lichtmikroskopische, proliferationskinetische und histochemische Befunde	8
1.3.2.1 Normale Dünndarmhistologie	8
1.3.2.2 Histologie der Dünndarmmukosa bei Zöliakie	9
1.3.3 Rasterelektronenmikroskopie	13
1.3.4 Dünnschnittelektronenmikroskopie bei Zöliakie	13
1.3.5 Freeze-Fracture-Elektronenmikroskopie	18
1.4 PATHOGENESE	19
1.4.1 Enzymmangeltheorie	19
1.4.2 Genetische Untersuchungen	20
1.4.3 Immunologische Befunde	21

	Seite
1.5	TIGHT JUNCTIONS 22
1.5.1	Struktur der Tight junction 23
1.5.2	Funktion der Tight junction 27
1.6	INTRAMEMBRANPARTIKEL 29
<u>2.</u>	<u>PROBLEMSTELLUNG</u> 31
<u>3.</u>	<u>MATERIAL UND METHODEN</u> 32
3.1	MATERIALIEN 32
3.1.1	Chemikalien und Geräte 32
3.1.2	Biopsiematerial 33
3.2	METHODEN 33
3.2.1	Herstellung der Gewebeschnitte 33
3.2.2	Gefrierschutz 34
3.2.3	Aufbringen auf Präparatträgerplättchen 35
3.2.4	Gefriermittel 35
3.2.5	Präparatlagerung 35
3.2.6	Gefrierbruch 36
3.2.7	Pt/C-Beschattung 36
3.2.8	Abflottieren der Proben 38
3.2.9	Reinigung der Replica 38
3.2.10	Aufbringen der Replica auf Kupfergrids 38
3.2.11	Elektronenmikroskopie 39
3.2.12	Quantitative Morphometrie 39
3.2.13	Morphometrische Auswertung histologischer Schnitte 44
3.2.14	Maschinelle Datensammlung und Auswertung 45
3.2.14.1	Korrektur von Einlesefehlern 46
3.2.14.2	Statistikprogramm 46

3.2.15	Statistische Auswertung nicht maschinell erfassbarer Daten	47
3.2.16	Standardisierung gemessener Größen	48
3.2.17	Statistische Tests	49
3.2.18	Rasterelektronenmikroskopie	49
 <u>4. EXPERIMENTELLE ERGEBNISSE</u>		 50
4.1	QUANTITATIVE AUSWERTUNG HISTOLOGISCHER MUKOSA- PRÄPARATE	54
4.1.1	Zottenlänge	54
4.1.2	Zottenbreite	54
4.1.3	Zottenlänge/Zottenbreite	54
4.1.4	Kryptenlänge	56
4.1.5	Kryptendurchmesser	56
4.1.6	Zottenlänge/Kryptenlänge	57
4.1.7	Mukosadicke	57
4.2	STRUKTUR DER TIGHT JUNCTIONS	58
4.2.1	Messung der Tight junction Tiefe	58
4.2.1.1	TJ-Tiefe der PF-Seite	59
4.2.1.2	TJ-Tiefe der EF-Seite	64
4.2.2	Erfassung der Zahl der TJ-Elemente	69
4.2.2.1	TJ-Leisten der PF-Seite	70
4.2.2.2	TJ-Furchen der EF-Seite	72
4.2.3	Durchschnittlicher Abstand der TJ-Elemente	78
4.2.4	Bestimmung der Triple-TJ-Länge	80
4.2.5	Quantitative Bestimmung aberrierender TJ- Elemente	82
4.3	INTRAMEMBRANPARTIKEL DER MIKROVILLUSMEMBRAN	88
4.3.1	IMP der PF-Seite	88

	Seite
4.3.2	IMP der EF-Seite 93
4.3.3	Vergleich der IMP-Dichte zwischen PF- und EF-Seite 96
4.4	MIKROVILLUSMORPHOLOGIE 98
4.4.1	Messung der Mikrovilluslänge 99
4.4.2	Mikrovillusdurchmesser 105
4.4.3	Vergleich von Mikrovilluslänge und -durchmesser 109
4.4.4	Dichte des Mikrovillusbesatzes der Zelloberfläche 110
4.4.5	Abnorme Mikrovilli 126
4.5	DÜNNDARMMORPHOLOGIE BEI ZÖLIAKIE 129
4.5.1	Verlust an Resorptionsfläche 130
4.5.2	Defizit an IMP 131
4.6	RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE 131
4.6.1	Normale Kontrollen 131
4.6.2	Floride Zöliakie 132
4.6.3	Zöliakie bei glutenfreier Diät 135
<u>5. DISKUSSION</u>	138
<u>6. ZUSAMMENFASSUNG</u>	145
<u>7. LITERATURVERZEICHNIS</u>	148
Anhang 1	174
Anhang 2	175

ABKÜRZUNGEN

ATJ	Aberrierende Tight junction
AZ	Absorptive Zellschicht
B	Bürstensaum
BZ	Becherzelle
EF	Exoplasmic Fracture Face; Membranhälfte, die an den Extrazellulärraum angrenzt.
EMI	Elektronenmikroskopie
GJ	Gap Junction (Nexus)
HLA	Histokompatibilitätsantigen
IMP	Intramembranpartikel der Mikrovillusmembran
KE	Kryptenepithel
LIF	Leucocyte Migration Inhibiting Factor
LM	Laterale Zellmembran
MV	Mikrovillus
nm	Nanometer (10^{-9} m)
PF	Protoplasmic Fracture Face; Membranhälfte, die an das Zytoplasma angrenzt.
TJ	Tight Junction (Zonula occludens)
TJ-Elemente	TJ-Leisten der PF-Seite und TJ-Furchen der EF-Seite
TTJ	Triple-TJ
TW	Terminal web
μm	Mikrometer (10^{-6} m)
V	Vesikel
V_k	Variationskoeffizient
ZK	Zellkern

VERZEICHNIS DER TABELLEN

	Seite
1. Biographische Daten der untersuchten Patienten	52
2. Klinische Daten der untersuchten Patienten	53
3. Anzahl der Messungen der TJ-PF-Tiefe	62
4. TJ-Tiefe der PF-Seite	62
5. Anzahl der Messungen der TJ-EF-Tiefe	65
6. TJ-Tiefe der EF-Seite	66
7. Leistenanzahl der PF-TJ	70
8. Zahl der TJ-EF-Furchen	75
9. Maschenweite der PF-Seite	78
10. Maschenweite der EF-Seite	79
11. Triple-TJ-Längen	80
12. Gesamtlänge erfasster apikaler TJ-Netze	85
13. Gesamtlänge aberrierender TJ-Elemente	85
14. Aberrierende TJ-Elemente (μm)/100 μm TJ (PF/EF)	85
15. Anzahl erfasster Probeflächen IMP-PF	90
16. Intramembranpartikel der PF-Seite	90
17. Anzahl erfasster Probeflächen IMP-EF	94
18. Intramembranpartikel der EF-Seite	94
19. IMP-Defizit der Mikrovillusmembranen bei Zöliakie	97
20. Verhältnis der EF-IMP zur Zahl der PF-IMP	97
21. Durchschnittliche Mikrovilluslänge	100
22. Mikrovillusdurchmesser	106
23. MV-Länge/MV-Durchmesser	109
24. Mittlere Mikrovillushäufigkeit ($\text{MV}/\mu\text{m}$)	118
25. Mittlere Mikrovillusdichte ($\text{MV}/\mu\text{m}^2$)	124
26. Gesamtzahl erfasster Mikrovilli	127
27. Abnorme Mikrovilli	127

1. EINLEITUNG

1.1 DEFINITION, HÄUFIGKEIT UND VERBREITUNG DER ZÖLIAKIE

Eine häufige Ursache eines Malabsorptionssyndromes im Kindesalter ist die Zöliakie, die auch als glutensensitive Enteropathie (GSE) oder einheimische Sprue bezeichnet wird.

Sie ist gekennzeichnet durch eine morphologische Schädigung besonders der proximalen Dünndarmschleimhaut und das sich daraus ergebende komplexe Malabsorptionssyndrom nach peroraler Aufnahme von Gluten aus dem Klebereiweiß von Weizen, Roggen, Gerste und Hafer (16, 140).

Die Beteiligung von Getreideprodukten an der Pathogenese der Zöliakie erkannte Andersen (1) bereits 1952. Mit Gliadin, als alkohollöslichem Bestandteil des Glutens, konnten dann Dicke et al. (36) den eigentlich toxischen Bestandteil isolieren.

Wieser et al. (186) konnten ein aus 53 Aminosäuren bestehendes Peptid isolieren, das in sehr niedrigen Konzentrationen Aktivität im immunologischen Test aufweist. Dieses Peptid besitzt ein Molekulargewicht von ca. 6000 Dalton und enthält reichlich Glx, Pro und Phe.

Die Zöliakie hat ihren Verbreitungsschwerpunkt vor allem in Nordamerika, Australien und Europa. Aus dem mitteleuropäischen Raum wird z.B. für die Schweiz eine Erkrankungshäufigkeit von 1:890 Geburten angenommen (152). Die Häufigkeit in den verschiedenen Ländern wechselt jedoch von 1:300 (Westirland) bis 1:3000 (England) in der Gesamtbevölkerung. Aus einer israelischen Untersuchung aus den Jahren 1968–1979 ergibt sich eine Inzidenz von 1:525 Lebendgeburten. Gleichzeitig wird dort eine starke Zunahme der Zahl diagnostizierter zöliakiekranker Kinder beobachtet (5).

Entsprechend dem Zeitpunkt der Einführung mehlhaltiger Lebensmittel in die kindliche Ernährung zeigen sich die ersten Symptome der Zöliakie am häufigsten am Ende des ersten bis zu Beginn des zweiten Lebensjahres (152, 56), mit einer Variationsbreite vom 6. Lebensmonat bis in das späte Kindesalter. Ashkenazi et. al. berichten, daß 36 % ihrer klinischen Fälle innerhalb des ersten und 68 % mit dem zweiten Lebensjahr diagnostiziert worden sind (5).

Die idiopathische Sprue des Erwachsenenalters ist wie Rubin et al. aufgrund vergleichender histologischer Untersuchungen feststellten, nur eine verschiedene Altersmanifestation der gleichen Erkrankung (131).

1.2 KLINIK

1.2.1 SYMPTOMATIK UND PATHOPHYSIOLOGIE

Die ersten Symptome entwickeln sich beim Säugling Wochen bis Monate nach Einführung einer glutenhaltigen Ernährung. Nach Henker (56) ist die klinische Symptomatik umso ausgeprägter, je jünger die Kinder zu Beginn der Erkrankung sind.

Die im Vordergrund stehenden Symptome sind (nach Signer (152)):

- Die chronische Diarrhoe mit voluminösen, breiigen Stühlen von blaßgrauer Farbe und üblem Geruch. Diese Stühle enthalten große Mengen unverdauter Fette. Das Verbleiben bzw. die bakterielle Zersetzung dieser Stoffe im Darm führt über eine gesteigerte Gas- und Wasserfüllung des Darms zu einem großen, schwappenden Abdomen.
- Die massive Dystrophie mit Schwund des Unterhautfettgewebes und hypotropher, hypotoner Muskulatur besonders des Gesäßes und der proximalen Extremitäten. Bei längerer Krankheitsdauer ist bevorzugt das Längenwachstum beeinträchtigt.

- Anorexie und psychische Alteration. Die Kinder sind häufig leicht reizbar, verdrießlich, übertrieben ängstlich und kontaktarm.

Teilweise besteht jedoch auch eine auffällige Symptomarmut, sodaß sich die Zöliakie lediglich als Minderwuchs manifestieren kann. Pathophysiologisch im Vordergrund steht die Malabsorption der Nahrungsfette. Dadurch wird besonders die Resorption der fettlöslichen Vitamine A, D, E und K betroffen.

Neben verminderter Aufnahme von Calcium kommt es über die Bildung von Kalkseifen mit höheren Fettsäuren im Darm zur Hypocalcämie, die zu einer gesteigerten Calciumfreisetzung aus dem Skelett führen kann.

Die Spaltung der Disaccharide sowie die Absorption von Monosacchariden, Wasser und Elektrolyten (Natrium, Kalium) ist ebenfalls vermindert. Die Spaltung von Proteinen und die Aufnahme der Aminosäuren ist meist nur geringgradig gestört (153).

Einige Begleitkrankheiten treten im Gefolge der Zöliakie auf: Eisenmangelanämie (Vitamin-B₆-Malabsorption), Rachitis bzw. Osteoporose mit pathologischen Frakturen, hämorrhagische Diathese aufgrund des Vitamin-K-Mangels, hypocalcämische Tetanie und Eiweißmangelödeme (49, 56).

1.2.2 DIAGNOSTIK

1.2.2.1 DÜNNDARMBIOPSIE

Nach den Kriterien der European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition (ESPGAN) liegt eine Zöliakie dann vor, wenn folgende Merkmale gegeben sind (99, 103):

- Es besteht eine andauernde Glutenintoleranz.
- Die Mukosa ist zu Beginn der Erkrankung flach und erholt sich

während einer nachfolgenden glutenfreien Diät. Die klinischen Symptome bessern sich.

- Die Wiedereinführung von Gluten in die Nahrung erzeugt ein histologisches Rezidiv innerhalb zweier Jahre.

Die wichtigste Maßnahme zur Diagnosestellung der Zöliakie ist damit die Dünndarmbiopsie (141), die zu drei Zeitpunkten im Bereich der Flexura duodenojejunalis durchgeführt werden muß (100, 174).

Im akuten Stadium der Erkrankung findet sich die typische flache Mukosa mit Zottenatrophie, Kryptenhyperplasie, Epithelabflachung, erhöhter Mitoserate und entzündlicher Infiltration der Lamina propria. Nach 2 Jahren glutenfreier Diät wird eine zweite Biopsie entnommen, die im typischen Fall eine völlig regenerierte Schleimhautarchitektur zeigt (56). Nach einer nun folgenden viermonatigen Glutengabe sollte die dritte Biopsie ein histologisches Rezidiv zeigen.

1.2.2.2 GEWEBEKULTURVERFAHREN

Der diagnostische Wert der Gewebekultur von Dünndarmbiopsien ist umstritten. Falchuk und Katz (43) fanden, daß im glutenfreien Kulturmedium eine morphologische und biochemische Normalisierung der Mukosa unbehandelter zöliakiekranker Patienten eintritt. Howdle et al. fanden keine reproduzierbaren in-vitro-Effekte von Gluten auf den Enzymbestand der Mukosa von Normalen, behandelten oder unbehandelten Zöliakiekranken (60).

1.2.2.3 LABORDIAGNOSTIK

Als Screeningtests und zur Absicherung der Diagnose stehen u.a. folgende Untersuchungsverfahren zur Verfügung:

a) 1-Std.-Blut-Xylosetest:

D-Xylose, eine vorwiegend im oberen Dünndarm resorbierte und wenig metabolisierte Pentose, wird peroral verabreicht und nach

einer Stunde die Xylosekonzentration im Blut bestimmt (128). Werte $< 1,3$ mmol/l (200 mg/l) sind pathologisch und ein Hinweis auf eine diffuse Schädigung der Mukosa. Bei Säuglingen und Kleinkindern hat sich dieser einfache Test als Untersuchung vor der Dünndarmbiopsie bewährt (151, 152).

Menzies et al. verwenden zur Bestimmung des Verlustes an absorbierender Dünndarmfläche L-Rhamnose (101).

b) Bestimmung von Serum-IgG-Antikörpern gegen Gliadin:

Im Blut zöliakiekranker Kinder können Antikörper gegen Gliadin nachgewiesen werden. Die Bestimmung erfolgt mit einem Fluoreszenz-Immunsorbent-Test und gilt in Kombination mit der 1-Std.-Blut-Xylosebestimmung als Screeningtest vor einer Biopsie (152).

Signer et al. (151) fanden bei allen von ihnen untersuchten floriden Zöliakiefällen Antikörper mit einem Titer $> 1:20$. Demgegenüber hatten nur 14 % der Kinder mit chronischer Diarrhoe bzw. Malabsorption Serumgliadinantikörper, jedoch mit niedrigerem Titer ($< 1:20$). In einer gesunden Population hatten nur 0,8 % der Probanden Antikörper gegen Gliadin (Titer $< 1:40$). Der Antikörpertiter sinkt unter glutenfreier Diät ab, die Antikörper verschwinden jedoch erst nach 6-24 Monaten völlig aus dem Serum. Unsworth et al. (175) wiesen mit einem Immunfluoreszenztest Gliadinantikörper im Blut bei 100 % der Zöliakiepatienten, aber auch bei 15 % ihrer Patienten mit anderen gastrointestinalen Störungen nach.

c) Leucocyte migration inhibiting factor test (LIF-Test):

Die Produktion eines LIF-Faktors durch Lymphozyten aus dem peripheren Blut gilt als in-vitro-Test für das Vorliegen einer zellulären Immunreaktion.

Durch die Zugabe von Glutenfraktionen zu Lymphozyten wurde nach Ashkenazi et al. bei 94 % der Zöliakiekranken eine signifikant erhöhte in-vitro-Produktion des LIF-Faktors beobachtet. Nur 6 % der Kontrollen waren falsch positiv (8).

Simpson et al. (156) fanden jedoch, daß der HLA-B8 Status bei Gesunden und Kranken in gleicher Weise zur Produktion des LIF-Faktors disponiert und relativierten damit die Aussagekraft dieses Tests.

d) Serum-IgA-Spiegel:

Der Serum-IgA-Spiegel steigt bei florider Zöliakie altersabhängig bis auf den doppelten Normwert an und ist damit ein möglicher Hinweis auf eine chronische Stimulation der B-Lymphozyten. Unter einer glutenfreien Diät sinkt der IgA-Spiegel wieder bis auf den Normalwert ab (4).

e) Stuhluntersuchung

Zum quantitativen Nachweis der Steatorrhoe wird eine 72stündige Fettbilanzierung nach van de Kramer durchgeführt (56). Dabei ist eine Fettausscheidung bis zu 5 g pro Tag als normal anzusehen (79).

1.2.3 THERAPIE

Die Therapie der Zöliakie (57) besteht in erster Linie in der lebenslangen Elimination des Glutens aus der Nahrung. Weizen, Roggen, Gerste und Hafer sowie alle daraus gewonnenen Produkte müssen gemieden werden. Erlaubt sind Mais, Reis, Soja und reine Getreidestärke (193).

Gegebenfalls ist für einen kürzeren Zeitraum eine laktosefreie Ernährung angebracht, da die Laktose bei dem sekundären Laktasemangel des Bürstensaums die Diarrhoe weiter unterhalten kann. Weiterhin können Eisen sowie die Vitamine D, E, K und Folsäure zur Deckung des häufig vorhandenen Defizits gegeben werden (73). Tritt trotz strenger Diät keine Besserung der Zöliakie auf ("refraktäre Sprue"), so bringt die Gabe von Kortikoiden oder anderen Immunsuppressiva bei einem Teil der Fälle Besserung (171).

1.2.4 PROGNOSE

Nach jahrelang eingehaltener, streng glutenfreier Diät führt der Genuß glutenhaltiger Speisen zwar immer zu einem histologischen Rezidiv, jedoch häufig erst Jahre später zu klinischen Symptomen (152).

Bei erwachsenen Zöliakiekranken besteht ein erhöhtes Risiko für die Erkrankung an Lymphomen und anderen Malignomen des Magen-Darm-Traktes (10, 11, 52).

Eine schlechte Prognose haben Patienten, bei denen sich in der Lamina propria abgelagertes Kollagen unter glutenfreier Diät nicht zurückbildet ("collagen sprue").

Nach Mörchen (104) findet sich eine überdurchschnittliche Häufung von Zöliakie und juvenilem Diabetes. Das jeweils gehäufte Auftreten des HLA-B8-Antigens gibt einen Hinweis auf eine gemeinsame genetische Grundlage dieser Erkrankungen.

1.3 MORPHOLOGIE DES DÜNNDARMEPITHEL

1.3.1 LUPENMIKROSKOPIE

Schon im Lupenmikroskop (Vergr. ca. 40x) zeigt die erkrankte Dünndarmschleimhaut ein sehr typisches Bild. Die normal finger- bis blattförmigen Zotten sind verplumpt (subtotale Zottenatrophie) oder fehlen völlig (totale Zottenatrophie). Die Öffnungen der Lieberkühn'schen Krypten, sonst von Zotten verborgen, liegen offen zutage und sind frei einsehbar. Häufig zeigt die Oberfläche durch Einziehungen eine mosaikartige Struktur (18). Die gesamte Mukosa wirkt verdickt und geschwollen.

1.3.2 LICHTMIKROSKOPISCHE, PROLIFERATIONSKINETISCHE UND
HISTOCHEMISCHE BEFUNDE

1.3.2.1 NORMALE DÜNNDARMHISTOLOGIE

Die **normale Mukosa** des menschlichen Dünndarms zeigt im histologischen Bild einen in Zotten und Krypten deutlich gegliederten Aufbau.

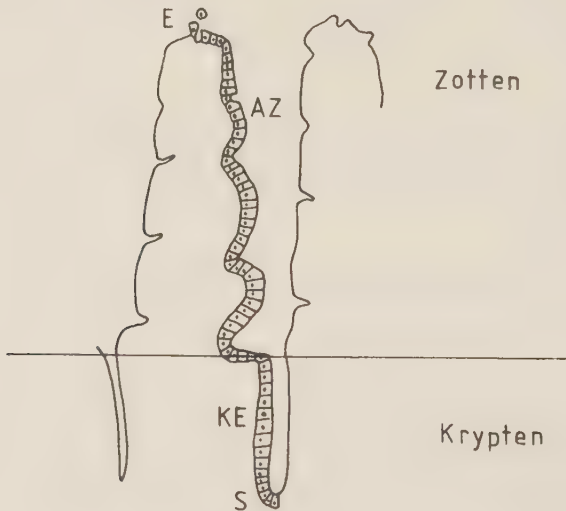


Abb. 1: Schematische Darstellung eines histologischen Schnittes durch die normale Mukosa des menschlichen Jejunums.

AZ Absorptive Zellschicht; E Extrusionszone; KE Kryptenepithel; S Stammzellzone.

Das Längenverhältnis Zotten/Krypten beträgt etwa 3-4 : 1 (145). Dabei sind Zotten und Krypten mit einem einschichtigen, hochprismatischen Epithel ausgestattet.

Im Kryptengrund liegt die Zone der Stammzellen, die Booth als Enteroblasten bezeichnet (18). Zottenwärts folgt darauf die Regenerationszone mit häufig zu beobachtenden Mitosefiguren. Die Zellen der folgenden und bis zum Kryptenmund reichenden Reifungszone zeigen keine mitotische Aktivität mehr. Sie reifen hier zu den resorptionsfähigen Enterozyten der Zotte. An der Zottenspitze liegt die Extrusionszone, aus der die Epithelzellen in das Darmlumen abgeschilfert werden.

Häufig sind intraepitheliale Lymphozyten anzutreffen (nach Stern und Dietrich sind zwischen 1000 Zellen des Oberflächenepithels 158 ± 43 Lymphozyten zu finden (163)).

Zwischen den Enterozyten bzw. Enteroblasten liegen die schleimbildenden Becherzellen (goblet cells) eingestreut, während die endokrinen, "basalgekörnnten" Zellen vornehmlich in der Krypte und die Paneth'schen Körnerzellen nur in der Stammzellzone am Kryptenfundus vorkommen (173).

Die Dünndarmmukosa ist ein hochaktives Wechselgewebe mit der höchsten Regenerationsrate aller Gewebe des menschlichen Körpers (17). Die Lebenszeit eine Zelle beträgt - von der Stammzelle bis zur Ausstoßung an der Zottenspitze - weniger als 5 Tage.

1.3.2.2 HISTOLOGIE DER DÜNNDARMMUKOSA BEI ZÖLIAKIE

a) Absorbierendes Epithel

Auffälligstes Merkmal ist die Reduktion der Zottenhöhe bis hin zu völligem Zottenverlust bei flacher Mukosa. Das Verhältnis Zottenlänge/Kryptenlänge ist auf durchschnittlich 0,16 erniedrigt.

Das Verhältnis "Länge des Oberflächenepithels (mm)/1 mm Muscularis mucosae Länge" ist auf $1,17 \pm 0,15$ (Normal: $6,07 \pm 0,58$) vermindert (129).

Die Zottendichte pro mm^2 ist von normal $19,05 \pm 1,4$ auf $1,55 \pm 1,02$ herabgesetzt (82). Der Zottenverlust ist aber nicht homogen.

Bei etwa der Hälfte der Patienten besteht eine fleckige Zottenatrophie. Dabei finden sich - in benachbarten Biopsien - flache Mukosa und Areale mit nur verplumpten Zotten (92, 137).

Die Enterozyten (absorbing cells) haben ihr hochprismatisches Aussehen verloren und sind kubisch oder flach. Die Epithelhöhe bei totaler Zottenatrophie ist $17,8 \pm 3 \mu\text{m}$, die normale Epithelhöhe beträgt $26,7 \pm 3,8 \mu\text{m}$ (37). Nach Stern et al. (163) nimmt die Höhe der Enterozyten von $34 \pm 2,5 \mu\text{m}$ auf $22 \pm 4,8 \mu\text{m}$ ab. Größe und Gestalt der Zellen sind unregelmäßig. Die Enterozyten zeigen starke Vakuolisierung, der Zellkern verliert seine basale Lage. Dadurch kann das Epithel geschichtet wirken. Gut differenzierte Zellen werden jedoch, auch an Stellen dichter Lymphozyteninfiltration, im Epithel gefunden (133).

Die Zahl der Becherzellen ist vermindert und diese besitzen einen geringeren Schleimgehalt als Becherzellen aus normalem Zottenepithel.

Die Zahl der intraepithelialen Entzündungszellen (v.a. Lymphozyten, vereinzelt Plasmazellen und Granulozyten) ist, bezogen auf die Zahl der Epithelzellen, erhöht. Insgesamt kommt es jedoch wegen der reduzierten Mukosafläche zu einer Verringerung der Gesamtzahl intraepithelialer Entzündungszellen (53).

Die intraepithelialen Lymphozyten sind hauptsächlich T-Lymphozyten (139). Dittmann fand zwischen 100 Zottenepithelzellen bei totaler Zottenatrophie 42 ± 17 Entzündungszellen gegenüber 11 ± 6 bei Normalen. Stern und Dietrich fanden 793 ± 173 intraepitheliale Lymphozyten zwischen 1000 Epithelzellen. Sie fanden, daß sich die Zahl der Lymphozyten als diagnostisches Kriterium zur Abgrenzung der floriden Zöliakie von Zöliakie unter Diät und von anderen gastrointestinalen Erkrankungen eignet (163).

b) Kryptenepithel

Lichtmikroskopisch ist die Mukosa bei Zöliakie, neben der Verkürzung und Verplumpung der Zotten (131), bis hin zu deren völligem Fehlen, vor allem durch die starke Verlängerung der Krypten

auffällig (189). Bei totaler Zottenatrophie sind diese von normalerweise $154 \pm 34 \mu\text{m}$ auf $374 \pm 67 \mu\text{m}$ verlängert (37), wobei sich die mittlere Zellzahl pro Kryptenlängsschnitt von 67 auf 141 Zellen erhöht. Andere Autoren fanden eine Verlängerung der Krypten von $119 \pm 21 \mu\text{m}$ auf $360 \pm 80 \mu\text{m}$ (163).

Gleichzeitig vergrößert sich der Kryptendurchmesser von $49 \mu\text{m}$ auf $56 \mu\text{m}$ durch Erhöhung der mittleren Zellzahl von 20 auf 26 Zellen je Kryptenquerschnitt. Die mittlere Gesamtzellzahl erhöht sich damit von normal 680 auf 1820 Zellen je Krypte bei totaler Zottenatrophie (37). Die Kryptendichte beträgt mit 127 ± 13 Krypten/ mm^2 nur 68 % des Normalwertes (82). Die starke Kryptenhyperplasie ist für die vermehrte Schleimhautdicke verantwortlich.

Die Epithelzellen des oberen Kryptendrittels erscheinen hochdifferenziert mit basalen Zellkernen, gleichmäßigem Bürstensaum und abgrenzbarem Terminal web.

Im mittleren Kryptendrittel finden sich undifferenzierte Zellen und bereits hochdifferenzierte Epithelzellen in unregelmäßiger Verteilung.

Die Zellen des basalen Kryptendrittels zeigen dichte apikale Granula als Zeichen sekretorischer Aktivität. Das Terminal web ist unentwickelt und der Bürstensaum nur spärlich zu erkennen (133).

Die Zahl der Paneth'schen Körnerzellen je 1000 Kryptenzellen ist auf 114 ± 44 (Normal: 82 ± 19) vermehrt (nach Vogel 1971 aus (33); siehe auch (138)).

Die Regenerationszone der Krypten zeigt bei der Zöliakie vermehrt Mitosen als Folge des vermehrten Zellverlustes in der Zone der absorbierenden Enterozyten (189). So befinden sich in der Regenerationszone der Krypten bei totaler Zottenatrophie 4,9 % der Zellen in Zellteilung gegenüber 2,5 % bei den Kontrollen (37). Padykula et al. (114) fanden Werte von 3,8 % bei Zöliakie und 2,2 % in normaler Mukosa.

c) Lamina propria

In der Lamina propria zeigen unter allen Entzündungszellen die Plasmazellen eine deutliche Zunahme von $17 \pm 12 \%$ auf $40 \pm 14 \%$ bei flacher Mukosa, wobei die Plasmazellen besonders in der Zone der Kryptenmündungen zu finden sind (37).

Der Hauptteil der Zellen enthält IgA (69,7 %), gefolgt von IgM und IgG enthaltenden Zellen. Die absolute Häufigkeit aller Plasmazellen der Lamina propria nimmt gegenüber den Kontrollen um den Faktor 2,9 zu. Überproportional nimmt dabei der Anteil der IgM- und IgG-enthaltenden Zellen zu (um den Faktor 4,9 bzw. 4,2). Eine unterdurchschnittliche Zunahme zeigen die Zellen mit IgA (x 2,6), IgD (x 2,6) und IgE (x 2,2), verglichen mit den Plasmazellen der Lamina propria normaler Kontrollen (163).

d) Zellkinetik

Die Wanderungszeit der Zellen von der Krypte zur Oberfläche ist auf 1-2 Tage verkürzt. Bei Zöliakie wurde eine Zellproduktion von 46 Zellen, bei Normalen von 12 Zellen pro Stunde an der Kryptenmündung berechnet (37). Die starken morphologischen Veränderungen zwischen den gut differenzierten Epithelzellen des oberen Kryptendrittels und den Zellen der absorbierenden Schicht treten innerhalb von 2-3 Zellpositionen an der Kryptenöffnung auf. Der Verlust an Zellen in das Darmlumen ist etwa verdoppelt.

e) Histochemische Befunde

Die absorbierende Zelle zeigt im apikalen Teil eine verstärkte Basophilie des Zytoplasmas, ein Hinweis auf einen erhöhten Gehalt an RNA. Histochemisch findet sich in den luminalen Zellen ein starker Mangel an Succinatdehydrogenase, Esterase, saurer Phosphatase und ATPase (114). Der Gehalt an Esterase in den Oberflächenzellen wechselt von Zelle zu Zelle stark, ist aber insgesamt geringer als der Gehalt der obersten Kryptenzone. Die Disaccharidasen, Dipeptidasen und die alkalische Phosphatase des Bürstensaumes sind reduziert (81, 82).

1.3.3 RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE

Die rasterelektronenmikroskopische Betrachtung der **normalen Zottenoberfläche** (9, 96, 97, 169) zeigt bei ca. 2000-facher Vergrößerung eine runzelige Struktur. Durch furchenartige Einziehungen sind Gruppen von Zellen voneinander abgegrenzt.

Die Einzelzelle ist von einem hexagonalen bzw. polygonalen Randsaum begrenzt (9). Becherzellen sind als ovale bis runde Öffnungen in der Oberfläche zu erkennen. Bei höherer Vergrößerung sieht man unter der Glykokalix verborgen die Spitzen der Mikrovilli als pflastersteinartige Struktur von 0,1-0,2 μm Durchmesser (94). Die errechneten 3000-6000 Mikrovilli je absorbierende Zelle vergrößern deren luminale Oberfläche etwa um den Faktor 30 (93).

Die Oberfläche der **Mukosa bei Zöliakie** zeigt die ovalen Kryptenöffnungen mit den sie verlassenden Enterozyten. Im Kryptenlumen findet sich amorphes Material, das wahrscheinlich aus Schleim und dem Sekret der Paneth'schen Körnerzellen besteht. Die Zellen scheinen aus den Kryptenöffnungen ringförmig hervorzutreten (18).

Die Oberflächenzellen haben ihre gleichmäßig hexagonale Form verloren und wechseln in Größe und Gestalt.

Häufig sind irreguläre Mikrovilli und ein unregelmäßiger Bürstensaum zu beobachten. Rubin weist darauf hin, daß nicht alle Zellen diese starken Veränderungen zeigen; die Zellen in der Krypte besitzen völlig normale Mikrovilli (18, 93).

Die Literatur enthält keine quantitativen Angaben über die Zahl geschädigter und normaler Bürstensäume. Ebenso fehlen Daten über die Lokalisation geschädigter Epithelzellen in der flachen Mukosa.

1.3.4 DÜNNSCHNITTELEKTRONENMIKROSKOPIE BEI ZÖLIAKIE

Bei der häufig angewandten Dünnschnittelektronenmikroskopie (3, 19, 55, 65, 113, 114, 119, 133, 134, 135, 136, 142, 143, 145,

146, 147, 148, 149) stimmen alle Untersucher darin überein, daß die wesentlichen Veränderungen der Dünndarmmukosa an den Zellen des Oberflächenepithels zu finden sind.

Alle vorgenannten Arbeiten beziehen sich jedoch auf Einzelbeobachtungen am Bürstensaum. Eine systematische Untersuchung der Zellschädigung liegt bislang nicht vor. Von einigen Autoren werden Zahlenwerte für verschiedene Zellbestandteile (Mikrovilli, Terminal web, Lysosomen) angegeben. In keinem Fall sind diese Größenangaben statistisch abgesichert. Die im folgenden genannten Zahlenwerte beziehen sich daher im wesentlichen auf ausgewählte Einzelmessungen. Sie erlauben keinen Rückschluß auf die durchschnittliche Veränderung der gesamten flachen Mukosa.

Eine zusammenfassende Darstellung der Ultrastruktur normaler Dünndarmmukosa findet sich bei Trier und Rubin (170).

Einen umfassenden Vergleich zwischen normaler Mukosa und flacher Mukosa bei Zöliakie legte Shiner 1983 vor (150).

Ultrastruktur bei Zöliakie im Kindes- und Erwachsenenalter

Nach Shiner treten qualitativ ähnliche ultrastrukturelle Veränderungen beim Kind und beim Erwachsenen auf, finden sich aber beim Kind in stärkerer Ausprägung. Häufiger noch als beim Erwachsenen treten beim Kind Entzündungszellen in den Interzellularspalten zwischen den Epithelzellen auf.

a) Zellen des Kryptenepithels

Die Zellen der Kryptenzone erscheinen insgesamt, verglichen mit Kryptenzellen aus normalem Gewebe (172), nicht verändert (143).

Epithelzellen aus der **Stammzellzone** zeigen wenige, kurze (0,3–0,6 µm), irreguläre Mikrovilli, ein unentwickeltes und schlecht abgrenzbares Terminal web, reichlich freie Ribosomen und membranummantelte Granula, die apokrin sezerniert werden. Im apikalen Bereich der Epithelzellen des unteren Kryptendrittels finden sich zahlreiche, kleine membranumschlossene Granula und Lysosomen. Die

Paneth'schen Körnerzellen erscheinen normal (133).

Im **mittleren Kryptendrittel** findet die Differenzierung der Zellen statt; die Bürstensäume entwickeln sich, die Länge der MV nimmt zu.

Die Epithelzellen des **oberen Kryptendrittels** sind gut differenziert und zeigen eine, den Epithelzellen dieser Zone aus normalem Gewebe vergleichbare Ultrastruktur. Der Bürstensaum ist regulär, von 0,7-1,0 μm Höhe mit schlanken Mikrovilli und intakter Glykokalix. Das Terminal web hat die übliche Tiefe von 0,8 μm und erscheint voll entwickelt. Wie in den Zellen des unteren Kryptendrittels, finden sich zahlreiche kleine, membranumschlossene Granula und Lysosomen im apikalen Bereich. Häufiger als bei Normalen sollen Mikrovillusbüschel an den Epithelzellen der oberen Krypte auftreten.

Becherzellen und argentaffine Zellen lassen keine morphologischen Abweichungen erkennen.

b) Ultrastruktur absorptiver Zellen des Oberflächenepithels

Die wesentlichen ultrastrukturellen Veränderungen werden am absorbierenden Epithel gefunden.

Dabei sind einzelne Epithelbereiche weniger stark betroffen, andere zeigen jedoch Vakuolisierung der Zellen bis hin zu oberflächlicher Ulzeration.

Die absorbierenden Zellen sind abgeflacht, kubisch, die Zellkerne sind polymorph und verlieren ihre streng basale Lage. Teilweise scheinen die Zellen unorientiert im Epithel zu liegen.

Die Mikrovilli sind auf durchschnittlich 0,6 μm verkürzt, verbreitert, entrundet und ausgelichtet. Die Glykokalix erscheint zerrissen oder fehlt (3).*

* Die Mikrovilli normaler Zotten sind zwischen 0,9 und 1,4 μm lang und besitzen eine geschlossene Glykokalix von 0,1-0,4 μm Dicke (65). Die Glykokalix repräsentiert die Kohlehydratketten der Membran-Glykoproteine und besitzt als Diffusionsbarriere wesentliche Bedeutung (159).

Die Bildung von Mikrovillusbüscheln ("branching") ist häufig (133, 143). Die einzelnen Mikrovilli zeigen den normalen Aufbau aus der 3-schichtigen Membran, den zentralen Filamenten und der Glykokalix.

Die Schädigung des Bürstensaumes scheint nicht homogen zu sein; der Bürstensaum kann sich über große Bereiche normal darstellen (3) und bei Erwachsenen mit flacher Mukosa wechselt nach Shiner (143, 147) der Grad an Abnormalität des Bürstensaumes von Zelle zu Zelle. Padykula fand ebenfalls streckenweise normale MV an den Oberflächenzellen (114). Epithelzellen mit nur geringer Längenreduktion der MV wurden von Rubin et al. beobachtet, wobei starke Veränderungen der MV stets mit schwer geschädigten Zellen verbunden waren.

Das Terminal web ist immer vorhanden. Gegenüber dem normaler Zellen erscheint es verschmälert und weniger dicht. Besonders die in die Zonula adhärens einstrahlenden, querliegenden Filamente sind regelmäßig vermindert. Rubin fand den gesamten "Junctional complex" und besonders die Tight junction auch zwischen schwer geschädigten Zellen immer erhalten. Er bemerkte keine strukturelle Veränderung, die eine Undichtigkeit diese Zone erklären könnte (133).

Abnormal große Lipidvakuolen (bis 7 μ m) können u.a. am apikalen Zellpol beobachtet werden; diese sind nach Rubin ein möglicher Hinweis auf eine Lipidstoffwechselstörung der Epithelzelle (133). Besonders der obere Pol der Epithelzellen zeigt verstärkte Vakuolisierung, vermehrte und vergrößerte Lysosomen, geschwollene und zum Teil zerrissene Mitochondrien und massenhaft freie Ribosomen (143, 113).*

Weiter ist das rauhe Endoplasmatisches Retikulum (rER) vermehrt und der Golgiapparat ausgeweitet, die Zahl der Mitochondrien und das glatte ER vermindert (3).

* Jones et al. fanden, daß in vitro die Proteinsynthese im Gewebe unbehandelter Zöliakiepatienten deutlich erhöht ist (66).

Neben den geschädigten Oberflächenzellen finden sich auch undifferenzierte Epithelzellen, die normal am Kryptenmund und im unteren Drittel der Zotte vorkommen. Diese Zellen erscheinen strukturell unverändert (143). Die Zellen am Kryptenmund erscheinen regelmäßiger, vergleichbar den Zellen des oberen Kryptendrittels Normaler.

Intraepitheliale Entzündungszellen sind nach Rubin nur Lymphozyten, Shiner (143) fand auch Eosinophile und polymorphkernige Granulozyten.

Die Lymphozyten zeigen wenig rauhes ER und wenige Zellorganellen.

Es besteht kein Zusammenhang zwischen der Zahl der durch die Basalmembran in das Epithel gewanderten Lymphozyten und dem Ausmaß der Epithelschädigung.

Die Becherzellen und die argentaffinen Zellen sind ebenfalls degeneriert (133). Die Basalmembran der Epithelzellen ist normal bis stark verdickt, die Verdickungen haben ein fleckiges Muster (3, 143). Jos et al. fanden durch Immun-EMI IgA-Ablagerungen in der Basalmembran der Epithelzellen (67).

c) Lamina propria

In der Lamina propria sind besonders die Plasmazellen sehr häufig, gefolgt von Lymphozyten, Makrophagen, Eosinophilen und - selten - Mastzellen und polymorphkernigen Granulozyten. Dabei zeigt die Mehrzahl der Plasmazellen erweiterte Zisternen des ausgedehnten rauhen ER, die prall mit elektronendichtem, amorphem Material angefüllt sind (150). Die Aktivität der Plasmazellen beim Kind scheint die der Plasmazellen beim Erwachsenen noch zu übertreffen (143).

Das Endothel der Blutgefäße erscheint bei Erwachsenen normal bis hyperplastisch, bei Kindern meist normal. Die Basalmembran der Endothelzellen ist häufig verdickt, Immunkomplexe konnten darin nicht nachgewiesen werden (143). Vereinzelt beobachtete Lymphgefäße sind normal.

Nach einmaliger Glutengabe fand Shiner (149) in mehreren aufeinanderfolgenden Biopsien die ersten ultrastrukturellen Veränderungen (Propriaödem, Infiltration mit Eosinophilen und polymorphkernigen Granulozyten, Kollagenfaservermehrung) im subepithelialen Gewebe. Erst danach wurde das absorptive Epithel geschädigt.

Araya und Walker-Smith fanden gleiche ultrastrukturelle Veränderungen sowohl an der Mukosa bei Zöliakie als auch bei anderen intestinalen Erkrankungen, sodaß diese Befunde nicht spezifisch für die Zöliakie sind. Diese Untersucher fanden keinen Zusammenhang zwischen dem Grad der lichtmikroskopischen Abnormalität und dem Ausmaß der elektronenmikroskopisch sichtbaren Veränderungen (3).

1.3.5 FREEZE-FRACTURE-ELEKTRONENMIKROSKOPIE

Durch die Gefrierbruchmethode werden Membranen entlang ihrer hydrophoben Zone gespalten. Sie eignet sich deshalb besonders zur Darstellung von intramembranär gelegenen Feinstrukturen (22, 27, 28, 30, 74).

Der Vergleich von Membranstrukturen menschlicher Jejunumzellen mit denen des Rhesusaffen ergab bei der Häufigkeit der Intramembranen Partikel (IMP) und bei der quantitativen Erfassung der Tight junction (TJ) Struktur in Zotten und Krypten verschiedene Absolutwerte. Diese Parameter zeigten jedoch bei beiden Spezies im Laufe der Differenzierung der Epithelzelle gleichsinnige Veränderungen. Strukturelle Unterschiede wurden bei den TJ zwischen Jejunum und Ileum des Affen gefunden (86).

Verschiedene Abschnitte des menschlichen Darmes (Jejunum, Colon) weisen TJ mit unterschiedlicher Geometrie und Komplexität auf (86, 87, 121).

Veränderungen der Membranfeinstrukturen von Jejunumepithelzellen bei Zöliakie im Erwachsenenalter wurden von Madara und Trier (85) untersucht. Seine Untersuchung bezieht sich allerdings nur auf wenige Patienten und eine geringe Zahl von EMI-Bildern.

Dabei fanden Madara und Trier bei den Intramembranpartikeln der Mikrovillusmembran eine Zunahme von der Krypte zur absorptiven Zellzone, wobei jedoch die Zahl der IMP/ μm^2 in der oberflächlichen Zellschicht um ca. 30 % unter der von Zotten Gesunder lag. Die IMP-Dichte der Kryptenzonen war gleich, auch die TJ-Breite und die Zahl der horizontalen TJ-Leisten waren bei Kryptenzellen Gesunder und Zöliakiekranker gleich, sie waren aber in der obersten Zellschicht bei Zöliakie jeweils geringer als die der Zottenepithelzellen Gesunder.

Unterbrochene TJ-Leisten wurden beobachtet. Diese veränderte TJ-Struktur wurde von Madara mit der abnormen Permeabilität des Epithels für große Moleküle wie Disaccharide (101), Cellobiose (54) und Proteine (31) in Verbindung gebracht (14, 15, 188).

1.4 PATHOGENESE

1.4.1 ENZYMMANGELTHEORIE

Die ersten Theorien zur Pathogenese der Zöliakie postulierten einen primären Enzymdefekt der Epithelzelle. Der Mangel an "gliadinspaltendem" Enzym und die daraus resultierende Anhäufung toxischer Produkte wurde für die Schleimhautschädigung verantwortlich gemacht (32).

Andria et al. fanden die Aktivität der Peptidasen in Totalhomogenaten der Mukosa zöliakiekranker Kinder stark erniedrigt. Aminopeptidase A, Carboxypeptidase und Dipeptidylaminopeptidase IV waren auf 31,2 %, 46,5 % und 63,8 % des Normalwertes reduziert. Besonders diese Peptidasen können Peptide mit Prolin und Glutaminsäure spalten, zwei Aminosäuren, die in Gliadin in großer Zahl enthalten sind. Weitere Peptidasen wurden ebenfalls in verschiedenen stark reduzierter Aktivität gefunden, ebenso Saccharidase mit 34,6 % des Normalwertes.

Bei Patienten mit regenerierter Mukosa nach glutenfreier Diät

sind die Peptidasen in normaler Aktivität vorhanden. Dies spricht gegen einen primären Enzymmangel des Bürstensaumes (2, 116).

1.4.2 GENETISCHE UNTERSUCHUNGEN

Genetische Untersuchungen zeigen, daß die Zöliakie familiär gehäuft vorkommt. Sie tritt bei ca. 5-10 % der Verwandten von Zöliakiepatienten auf. Doherty fand charakteristische Schleimhautveränderungen und eine Verdopplung der Zahl intraepithelialer Lymphozyten nach hohen Gliadindosen bei gesunden Verwandten 1. Grades mit zuvor normaler Mukosa (38).

Ein weiterer Hinweis auf eine genetische Disposition zur Zöliakie ist die Häufung bestimmter Histokompatibilitätsantigene (HLA-Antigene) bei Zöliakiepatienten. So findet sich das HLA-B8 Antigen bei 60-90 % der Erkrankten - die Häufigkeit in der Normalbevölkerung ist ca. 20-25 % (44).

Ashkenazi et al. (7) fanden das HLA-B8 Antigen bei erkrankten Kindern in 56 % der Fälle, in der Kontrollgruppe nur bei 11 % der Untersuchten.

Das HLA-DW3 Antigen ist bei 80 % der Zöliakiepatienten und nur bei 20-30 % der Individuen aus der Normalpopulation vorhanden. Es wird diskutiert, daß das HLA-System eine enge Verbindung zu einem "immune response gene" besitzt.

Eine weitere Möglichkeit ist, daß Membranproteine, die als Gliadinrezeptor* wirken, vom HLA-System codiert werden. Es konnte gezeigt werden, daß Mukosabiopsien von Patienten mit HLA-B8 Status in der Gewebekultur empfindlicher auf Gluten reagieren, als solche von Patienten ohne HLA-B8 (44).

Da 20-30 % der Bevölkerung das HLA-B8 und bzw. oder HLA-DW3 Antigen besitzen ohne zu erkranken, wurde ein zusätzlicher genetischer Marker für die Manifestation der GSE postuliert.

* Rubin demonstrierte mit Immunfluoreszenzmethoden die Bindung von Gliadin an die Oberfläche von Epithelzellen (132). Stern und Dietrich fanden mit verfeinerten Methoden keine Bindung von Gliadin an das Epithel (164).

Mann et al. (91) entdeckten ein Antigen auf der Oberfläche von B-Lymphozyten, das bei Patienten mit Zöliakie mit 75-80 % und in der Kontrollgruppe nur mit 6-18 % Häufigkeit gefunden wurde (115). Daher wird diskutiert, daß sich die Zöliakie dann manifestiert, wenn zusätzlich zum HLA-B8/DW3 Status das betreffende Gen ("B-Zell-GSE-assoziiertes Gen") homozygot vorhanden ist.

1.4.3 IMMUNOLOGISCHE BEFUNDE

Die Beobachtung, daß sowohl die Zahl der intraepithelialen Lymphozyten, als auch die Zahl der Lymphozyten und ganz besonders der Plasmazellen in der Lamina propria stark erhöht ist, machen eine Beteiligung des Immunsystems wahrscheinlich (6, 62, 88, 110, 144, 149, 182).

Stern et al. fanden bei allen floriden Zöliakien und bei 71 % der Patienten unter Diät in der Lamina propria Gliadin- und Antigliadinimmunglobulin enthaltende B-Zellen. Diese Zellen enthielten v.a. IgA, gefolgt von IgM und IgG.

Die Zahl dieser Zellen unter allen Immunglobulin enthaltenden B-Zellen war jedoch klein - je nach Ig-Klasse zwischen 0,9 % (E) und 8,4 % (G). Normale Patienten besaßen keine derartigen Zellen (164).

Das Vorkommen von Antikörpern gegen eine Fraktion aus Gluten in B-Zellen der Lamina propria, von Serum IgG-Antikörpern, von Antikörpern gegen Kuhmilchproteine (151), Antikörpern gegen einen Vielzahl von Nahrungsmittelproteinen und Retikulinantikörpern (130) ist ein möglicher Hinweis auf eine abnorme Permeabilität des Epithels.

Serumgliadinantikörper (v.a. IgG und IgM) wurden zwar bei Zöliakie in teilweise sehr hohen Titern gefunden, sie kommen aber auch bei anderen Enteropathien und bei Normalen (wenn auch meist in niedrigen Titern) vor (151).

Eine zelluläre Immunantwort leiten Howdle et al. aus der Produktion von LIF durch Biopsiegewebe unbehandelter Zöliakiepatienten

in der Gewebekultur ab. Das Ausmaß der LIF-Produktion des Gewebes korrelierte mit der Anzahl intraepithelialer Lymphozyten (61). Der LIF-Faktor wurde von Zöliakiepatienten unter Diät nicht produziert.

Ein aktuelles Modell der Pathogenese (165) postuliert die Bindung des Glutens an einen Rezeptor der Epithelzelle, der vom HLA- und dem B-Zell-GSE-assoziierten Gen codiert wird. Diese Bindung löst eine Immunantwort aus, die zur Produktion von Antigluten-Antikörpern, Lymphokinen und sensibilisierten Lymphozyten führt. Die jeweilige Immunantwort führt dann zur Schädigung und Lysis der Enterozyten (95).

1.5 TIGHT JUNCTIONS

An den Zellmembranen von Wirbeltierzellen gibt es 3 Arten von Membranfeinstrukturen, die dem Zell- zu Zell- Kontakt dienen (185):

- Tight junctions (Zonula occludens)
- Gap junctions (Nexus)
- Desmosomen (Maculae adhaerentes)

Während die Desmosomen der mechanischen Verbindung benachbarter Zellen dienen, ermöglichen die Gap junctions (191) den Austausch kleinmolekularer Stoffe zwischen Zellen und deren elektrische Kopplung.

Die Tight junction (TJ) findet sich stets am apikalen Pol von Epithelzellen, erkennbar als ein Ort besonders enger Annäherung zweier Zellen unterhalb des Bürstensaumes (160, 161).

Tight junctions treten auch zwischen Endothelzellen auf (190).

Die Aufgabe der Tight junctions liegt in der Regulation der transepithelialen Permeabilität bzw. in der Verhinderung einer parazellulären Absorption höhermolekularer Stoffe (20, 24). Ein Beitrag zur mechanischen Stabilität der Zellkontakte wird diskutiert (90).

1.5.1

STRUKTUR DER TIGHT JUNCTION

In der Dünnschnittelektronenmikroskopie erscheinen benachbarte Zellmembranen am apikalen Zellpol stellenweise als eine pentalaminare Struktur. Die beiden äußeren Membranblätter sind durch ein "adhesion particle" unterbrochen (162). Auch sind beide Membranen gemeinsam nur noch ca. 150 Å breit und damit schmaler als die beiden beteiligten Einheitsmembranen (185).

Anhand von Negativkontrastaufnahmen beschrieben Goodenough und Revel (50) die Tight junction als ein gürtelförmig die Zelle umgebendes Netzwerk. Dies wurde seitdem in zahlreichen Arbeiten mit der Gefrierbruchmethode an vielen Geweben und unter mannigfaltigen experimentellen Bedingungen (z.B. 30, 45, 35, 181) bestätigt. Da beim Gefrierbruch die Zellmembran entlang ihrer hydrophoben Mitte aufgespalten wird (108), muß das dabei beobachtete netzartige System von Leisten (PF-Seite) bzw. korrespondierenden Furchen (EF-Seite) (21) eine intramembranäre Struktur wiedergeben.

Die TJ zeigt - je nach Spezies und Epithel - große Unterschiede in Ausdehnung und Organisation (z.B. 68).

Hull und Staehelin wiesen durch Hochspannungs-EMI am Dünndarm von *Xenopus laevis* eine enge Beziehung der TJ zum Terminal web nach. Die oberste Zone des TW enthält demnach ca. 70 Å breite Filamente. Diese sind an der Basis der im MV längsverlaufenden Filamente ("core-Filamente") und an der Zellmembran zwischen den Mikrovilli, sowie auch an der Membranzone der TJ verankert. Dabei ist ein Paar dieser 70 Å Filamente (ein Filament von jeder beteiligten Zelle aus) an der Stelle der Membranfusion mit der Zytoplasmamembran verbunden (64).

a) Erscheinungsbild der TJ im Gefrierbruchbild in Abhängigkeit von Fixierung, Gefriermittel und Gefrierschutz

Die TJ erscheint bei Zellen, die mit Glutaraldehyd fixiert wurden, als ein System von Leisten auf der PF-Seite und ein Netzwerk

aus Furchen auf der EF-Seite der Membran (102).

Wird unfixiertes Gewebe gebrochen, so zeigen sich nach dem Einfrieren mit Propan, Freon oder Stickstoff (Standardgefrieren) Reihen von Partikeln auf der EF-Seite (34), nach Schnellgefrieren mit Helium zylindrische Fibrillen auf der EF-Seite (71).

Nach Imprägnieren mit 100 % Glycerin zeigen sich - auch bei vorangegangener Fixierung mit Glutaraldehyd - nur Partikelreihen der PF- und EF-Seite (154).

Im Innern gefrorener Gewebestückchen wurden Partikelreihen, in den randnahen Bereichen mit schneller Abkühlrate und geringer Eiskristallbildung wurden fibrilläre TJ-Leisten gefunden.

Schnellgefrorenes (Propanjet, Helium), unfixiertes, unglyceriniertes Gewebe zeigt TJ-Fibrillen (154).

Durch umfangreiche Prüfung komplementärer, rotationsbeschatteter Pt-Replica konnten Easter et al. feststellen, daß das lückige Erscheinungsbild der TJ-Elemente aus der Präparation der Freeze-Fracture Replica herrührt und somit keine physiologische Bedeutung besitzt (41).

b) Modelle zu Struktur und Aufbau der TJ

Lange Zeit blieb unklar, ob die TJ aus einem oder zwei TJ-Strängen besteht.

Wade und Karnovsky (180) beschrieben einen dicken TJ-Strang, Bullivant (25) postulierte zwei übereinandergelagerte Fibrillen, die seitlich versetzt sind.

In letzter Zeit konnte Hirokawa durch Trennung der TJ mit hypertonischer Saline und Schnellgefrieren mit Helium ohne Fixation und anschließendem Tiefätzen die Doppelsträngigkeit der TJ nachweisen. Außerdem erhielt er Hinweise auf eine seitlich versetzte Lage der Fibrillen (59).

Der molekulare Aufbau der TJ ist nicht geklärt.

Erste Hypothesen über die Biochemie der TJ-Fibrille orientierten

sich am Erscheinungsbild der TJ im Freeze-Fracture Replica (161). Die häufig aus einzelnen Partikeln zusammengesetzt erscheinende Feinstruktur der TJ führte zur Annahme, daß die TJ aus Proteinen aufgebaut sei. Da die ebenfalls in unmittelbarer Nähe der TJ vorkommenden IMP als integrale Membranproteine gedeutet werden, dachte man sich die TJ aus diesen aufgebaut und durch Glutaraldehyd zu einer bzw. zwei Fibrille(n) vernetzt (162, 34).

Bewiesen wurde die Beteiligung von Proteinen an der Bildung der TJ durch Hemmung der Proteinbiosynthese. Cycloheximid konnte die TJ-Bildung nur dann hemmen, wenn seit der Anwendung mehr als 12 h vergangen waren.

Daher wurde eine Phase der TJ-Proteinsynthese und eine Phase der TJ-Formierung postuliert.

Die TJ-Proteine werden durch Trypsin zerstört und unterliegen keinem hohem Umsatz. Die Protein- und die m-RNA-Synthese erfordert keinen Zell-zu-Zellkontakt (51).

Aus der Beobachtung von Veränderungen der TJ-Fibrillen unter verschiedenen Fixations-, Gefrierschutz- und Einfrierbedingungen entwickelten da Silva, Kachar und Reese in letzter Zeit ein hypothetisches TJ-Modell, wonach die TJ aus einer oder zwei in der Membran liegenden, inversen und zylindrischen Lipidmizelle(n) besteht (70, 154) (Abb. 2)

Dabei werden Anteile an integralen Membranproteinen und Kontakte zu Zytoskelettstrukturen diskutiert. Nach diesem Modell sind die extraplasmatischen Membranhälften zu einem kontinuierlichen Membranblatt verschmolzen und die Junctionstabilität wird durch integrale Membranproteine, die in Verbindung zum Zytoskelett stehen, aufrechterhalten.

Die Vielgestaltigkeit der TJ im Freeze-Fracture-Replica wird durch Veränderungen beim Gefriervorgang erklärt. TJ-Partikel gelten danach als Reste zylindrischer Lipidmizellen, die während des Einfriervorganges zerstört worden sind.

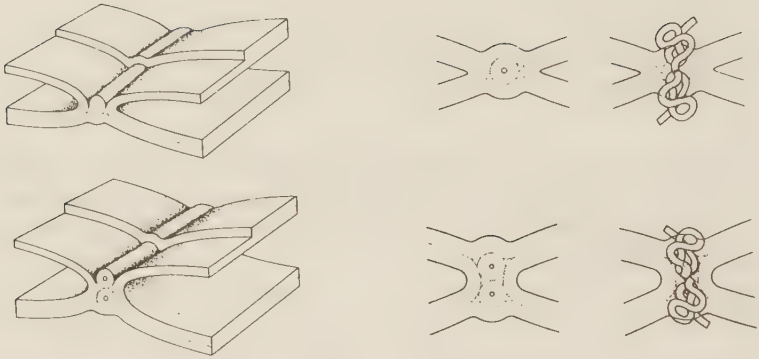


Abb. 2: Hypothetisches Modell der TJ-Struktur nach Kachar und Reese. Erklärung siehe oben.

Für dieses Modell gibt es jedoch bislang keinen experimentellen Nachweis.

c) Induktion, Bildung und Abbau von TJ

Auch über Bildungs- und Abbauvorgänge der TJ gibt es bislang nahezu keine gesicherten experimentellen Erkenntnisse. Einige Befunde belegen jedoch, daß es sich bei der TJ um eine sehr dynamische und flexible Membranstruktur handelt, die unter verschiedenen experimentellen Bedingungen rasch gebildet und abgebaut werden kann (63, 84, 120).

Es wurde gezeigt, daß sich die gesamte TJ-Länge im Prostata-epithel der Ratte durch 5-minütige Inkubation bei 37°C auf das Fünffache vermehrt.

Dabei nimmt die Zahl der IMP in der Umgebung der TJ nicht ab und es finden sich keine Veränderungen des apikalen TJ-Netzes (69).

Nach Gabe von cyclo-AMP wurde am Gallenblasenepithel von Necturus eine reversible Ausdehnung der TJ-Tiefe und der Leistenzahl um ca. 40 % gefunden. Die Dichte der TJ-Leisten pro μ blieb gleich, der transepitheliale elektrische Widerstand nahm reversibel zu (40).

Durch die Belastung der Dünndarmmukosa des Meerschweinchens mit hyperosmolarer Lösung stieg der transepitheliale Widerstand innerhalb von 20 min um 64 % an. Gleichzeitig stieg die Zahl der TJ-Elemente von 5,3 auf 6,3 und die TJ-Tiefe von 266 nm auf 303 nm an. Die Kationenselektivität der TJ sank ab. Cytochalasin D hemmte den Anstieg des elektrischen Widerstandes um etwa die Hälfte, Kältebehandlung (4°C) verhinderte die Widerstandserhöhung und die Veränderung der TJ-Struktur (83).

Experimentell lassen sich TJ an Colonicarcinomzellen durch Behandlung mit Proteasen (Trypsin, Papain, Plasmin etc.) in vitro innerhalb weniger Minuten erzeugen. Dabei lassen sich Induktions- und Expressionsphase zeitlich trennen (166).

Über Abbauvorgänge der TJ ist nichts bekannt.

Polak-Charcon et al. beobachteten TJ-Elemente in intrazellulär und extrazellulär gelegenen Vesikeln. Diese wurden als Reste abgebauter TJ-Bänder interpretiert (121, 122).

1.5.2 FUNKTION DER TIGHT JUNCTION

Es herrscht allgemein Übereinstimmung, daß eine wesentliche Funktion der Tight junction in der Regulation der parazellulären Permeabilität besteht (20, 162).

Dünnschnittuntersuchungen mit elektronendichten Markierungstoffen (z.B. Lanthanhydroxid) zeigten, daß die Tight junction den

Interzellularraum wirksam gegen das Lumen abschließt (45). Dadurch wird ein unkontrolliertes Übertreten von Stoffen aus einem Lumen durch ein Epithel verhindert.

Ausmaß und Komplexität von Tight junctions variieren in den verschiedenen Epithelien stark (123, 127, 184) und reichen von einem einzigen Tight junction-Strang im proximalen Tubulus contortus der Niere der Maus bis zu ca. 8 Tight junction-Strängen zwischen Epithelzellen aus Amphibienharnblasen.

Claude und Goodenough konnten eine direkte Korrelation zwischen der Zahl der Leisten sowie der Tight junction-Tiefe und der transepithelialen Durchlässigkeit der entsprechenden Gewebe feststellen. (Als Parameter für die Funktion der TJ dient der transepitheliale elektrische Widerstand).

Dabei zeigten durchlässige Gewebe eine geringere Zahl von TJ-Leisten und damit eine geringe Tiefe der TJ sowie niedrigen transepithelialen elektrischen Widerstand. Als physiologisch dicht bekannte Epithelien hatten eine große TJ-Tiefe, eine hohe Zahl von TJ-Leisten und hohen elektrischen Widerstand (30).

Martinez und Erlji fanden, daß die Permeabilität der TJ nicht nur vom geometrischen Aufbau des TJ-Bandes, sondern auch von experimentell beeinflussbaren Eigenschaften der TJ-Fibrille selbst kontrolliert werden muß (98).

Neben dieser Hauptfunktion als Permeabilitätssperre werden der TJ weitere Funktionen für die Aufrechterhaltung der Membranasymmetrie für Lipide (39) und für die Proteinverteilung zwischen apikaler und lateral-basaler Zellmembran zugeschrieben.

Der größte Teil des passiven Ionenflusses geht - an der Epithelzelle vorbei - durch die TJ hindurch (46) und wird durch die TJ reguliert (40).

1.6 INTRAMEMBRANPARTIKEL

Zellmembranen, die durch die Gefrierbruchmethode entlang ihrer apolaren Zone (157) gespalten werden, erscheinen im Gefrierbruchbild mit unregelmäßig verteilten Partikeln besetzt. Die Natur dieser Partikel ist noch nicht geklärt (168).

Die Größe der Intramembranpartikel reicht von ca. 4-13 nm (77, 86), wobei Partikel der Größe von 6-9 nm am häufigsten zu finden sind.

Im Gefrierbruchbild, das aus glutaraldehydfixiertem Gewebe gewonnen wird, treten die Partikel häufig auf der PF-Seite der Membran auf, während Partikel der EF-Seite seltener zu sehen sind. Die Partikel zeigen nur selten komplementäre Vertiefungen.

Die Verteilung der Partikel auf die Membranhälften wird in weit geringerem Maße durch Fixations- und Gefrierschutzvorgänge beeinflusst als die Anordnung der TJ.

Nach der gegenwärtig am häufigsten vertretenen Ansicht repräsentieren diese Partikel integrale Membranproteine und Lipopolysaccharide (42). Dabei sollen nichtkomplementäre Partikel v.a. Proteine, komplementäre Partikel bevorzugt Lipide darstellen (178).

Hinweise auf die mögliche Identität der Intramembranpartikel mit Membranproteinen (155) ergaben sich aus experimentellen Veränderungen der Partikeldichte und aus Markierungsversuchen von Liposomen mit definierten Proteinen:

Bei Behandlung von Erythrozytenmembranen mit Proteinasen konnte eine rasche Abnahme der Membranpartikeldichte in Abhängigkeit von der Proteinextraktion beobachtet werden (111). Umgekehrt wurden im Gefrierbruchbild partikelfreie Liposomen mit Proteinen definierter Größe markiert. Anschließend fand man im Freeze-Fracture Replica partikelbesetzte Membranen. Die IMP hatten dabei die Größe der zugefügten Proteine (176).

Nach dem Gefrierbruch wurden verschiedene Proteine der Erythrozytenmembran regelmäßig in der PF- bzw. EF-Seite der Membran gefunden (178).

Die meisten Autoren nehmen deshalb an, daß es sich bei den IMP bevorzugt um integrale Membranproteine bzw. -glycoproteine oder deren Aggregate handelt, die im Gefrierbruchreplica sichtbar gemacht werden.

Daß die Dichte und Verteilung der IMP der Zellmembran vom Funktionszustand der Zelle abhängig ist, zeigten de Laat et al. an Neuroblastomzellen aus verschiedenen Phasen des Zellzyklus (78).

An Epithelzellen des Jejunums beim Menschen und beim Affen nimmt die durchschnittliche IMP-Dichte im Laufe der Zelldifferenzierung zu (85, 86).

2. PROBLEMSTELLUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden mit elektronenmikroskopischen Methoden Veränderungen an Feinstrukturen der Zellmembran von Jejunumepithelzellen bei florider kindlicher Zöliakie untersucht.

Zu prüfen war, ob die Tight junctions der Jejunumepithelzellen bei Zöliakie in ihrem Aufbau Veränderungen zeigen, die es erlauben, sie mit der erhöhten Permeabilität des Epithels für große Moleküle (14, 15, 31, 54, 101) in Verbindung zu bringen.

Quantitativ erfasst wurden gleichzeitig Veränderungen im Aufbau des Bürstensaumes, speziell der Größe und Häufigkeit der Mikrovilli. Dadurch war es möglich, quantitative Aussagen über die Verminderung der resorptionsfähigen Dünndarmfläche zu treffen.

Die Zahl der in der Zellmembran der Mikrovilli anzutreffenden Intramembranen Partikel (IMP) wurde bestimmt.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIALIEN

3.1.1 CHEMIKALIEN UND GERÄTE

Bacto-Glycerin und Bacto-Agar wurden von Difco, Detroit, USA, Na-Cacodylat von Serva, Heidelberg, Eukobrom von Tetenal, Berlin, geliefert. Kupfergrids Cu G 400 wurden von Hert Mikrotechnik, München, Bedampfungsmaterial (Kohlestäbe, Platineinsätze, Kohleelektroden, Wolframkathoden), Cu-Präparatträgerplättchen, Präparatkörbe, Platinösen von Balzers Hochvakuumtechnik, Wiesbaden, geliefert.

Die Dünndarmbiopsien wurden mit einem Sorvall TC-2 Tissue Sectioner, Du Pont de Nemours, Bad Nauheim in verschiedene Gewebezonen geteilt.

Die Gefrierätzungen wurden mit einer Balzers BA 360 M Gefrierätzanlage mit angebauter Schnellwechselschleuse, Elektronenstrahlverdampfungseinrichtung EVM 052 mit Verdampferkopf EK 552 und Doppelbruchtisch durchgeführt. Zur Kontrolle der Bedampfungsdicke wurde ein Quarz Crystal Thin Film Monitor QSG 101 (Balzers) benutzt.

Zur Elektronenmikroskopie wurde ein JEOL JEM 100 CX, Jeol LTD., Tokio, Japan, verwendet.

Die quantitative Auswertung der Negative erfolgte auf einem Leitz-A.S.M. Bildanalysesystem mit dem Programm ASM 32K, angebautem Projektor Prado Universal von Leitz, Wetzlar, und einem Model 700 Printer, Centronics, Hudson, USA.

Die statistische Auswertung wurde mit einem Tischrechner alpha-Tronic TA/P2 und einem Drucker DRH 80 GAD 201, beide von Triumph Adler, Nürnberg, durchgeführt.

Folgende optische Geräte wurden verwendet:

Stereomikroskop DR mit Durchlichtzusatz, Inverses Mikroskop IM 35, beide von Zeiss, Oberkochen, Meßprojektor ST 100, Schneider Optotechnik, Bad Kreuznach.

3.1.2 BIOPSIEMATERIAL

Die untersuchten Dünndarmbiopsien wurden von Prof. A. Ashkenazi, Department of Pediatrics A, Kaplan Hospital, Rehovot, Israel, zur Verfügung gestellt. Sie wurden im Rahmen der Klinikdiagnostik gewonnen.

Die Biopsien wurden mit einer Careysonde unter fluoroskopischer Kontrolle an der Flexura duodenojejunalis entnommen.

Sofort nach der Entnahme wurde das für die Elektronenmikroskopie bestimmte Gewebe 24 h mit 2,5 % Glutaraldehyd (34) in 0,2 M Na-Cacodylat bei pH 7,4 fixiert (125).

Die Fixierung erfolgte unter Eiskühlung. Anschließend wurde das Gewebe in 0,2 M Na-Cacodylatpuffer pH 7,4 überführt.

3.2 METHODEN

3.2.1 HERSTELLUNG DER GEWEBESCHNITTE

Die Biopsieproben wurden zuerst stereomikroskopisch auf Übereinstimmung mit der histologischen Diagnose kontrolliert und größere Proben wurden in ca. 0,5 x 0,5 mm große Stücke geteilt. Gewebestücke, die eine stärkere Krümmung aufwiesen, wurden ausgesondert.

Die Schleimhautstückchen wurden seitlich auf ein Filterpapier (5,5 cm) aufgesetzt und sofort mit 2-3 Tropfen 3 %igem Agar aus dem Wasserbad (55°C) bedeckt. Bis zur Verfestigung des Agars wurde das Gewebestück mit einer feinen Pinzette vorsichtig in

seitlicher Lage gehalten. Anschließend wurde das Filterpapier mit Duco Cement (Du Pont) auf den Schneidetisch des Tissue Sectioners Sorvall TC-2 (Du Pont) aufgeklebt. Der Agartropfen wurde mit einer Rasierklinge grob rechteckig zugeschnitten. Danach wurde das Agarblöckchen mit dem eingebetteten Gewebe streng parallel zur Schleimhautoberfläche in 150 μm dicke Scheiben geschnitten. Eine handelsübliche Rasierklinge (Schick injector platinum) diente als Messer. Die Schlagstärke des Messers wurde auf Stufe "5" eingestellt.

Als absorptive Zellschicht wurde bei Gewebe mit flacher Mukosa nur die jeweils erste Gewebescheibe ausgewählt. Bei normaler Mukosa wurde der erste Schnitt oder - falls der erste Anschnitt nur kleine Zottenspitzen lieferte - auch der zweite Schnitt verwendet. Als Kryptengewebe wurde jeweils der letzte Gewebeanschnitt mit Kriptenquerschnitten verwendet. Gewebescheiben, die nur geringe Kriptenanteile - die Stammzellzone am Kryptengrund - aufwiesen, wurden ausgesondert und die nächstfolgende Gewebeschicht verwendet.

Am Gewebe anhaftender Agar wurde unter stereomikroskopischer Kontrolle vorsichtig abpräpariert.

Jeder Gewebeschnitt wurde unter einem Tropfen 0,1 M Na-Cacodylat im inversen Mikroskop IM 35 kontrolliert. Eindeutig orientierte Schnitte wurden bei 32- und 100-facher Vergrößerung fotografiert (Contax RTS mit Contax Data Back, SW-Film Agfapan 100 professional). Jede Aufnahme wurde unter ihrer Data Back Nummer dokumentiert.

3.2.2 GEFRIERSCHUTZ

Das Gewebe wurde mit Glycerin als Gefrierschutzmittel vorbehandelt (89). Verwendet wurde ein Gemisch von 20 % Glycerin in 0,1 M Na-Cacodylat pH 7,4. Die orientierten Gewebescheibchen wurden darin 1-2,5 h bei Raumtemperatur einzeln in kleinen Petrischalen (Fa. Greiner) inkubiert.

3.2.3 AUFBRINGEN AUF PRÄPARATTRÄGERPLÄTTCHEN

Zur Montage der Gewebescheibchen für den Gefrierbruch nach der Doppelreplicamethode wurden je zwei Kupferpräparatträgerplättchen mit ebener Auflagefläche benutzt. Die beste Haftung zwischen Gewebe und Trägerplättchen ergab sich, wenn die Metalloberfläche durch längere Lagerung in H_2O dest. langsam oxidiert und durch mehrmalige Pt/C-Bedampfung beschichtet worden war. Dadurch wurde in bis zu 90 % der Fälle ein Bruch im Gewebe erreicht. Die Behandlung der Metalloberfläche mit starken Mineralsäuren (HNO_3 , H_2SO_4) ergab dagegen keine bessere Haftung des Gewebes am Trägerplättchen. Durch Waschen in destilliertem Aceton wurden die Trägerplättchen entfettet und anschließend mit sauberem Filterpapier vollständig getrocknet. Die Gewebescheibchen wurden mit einer geringen Menge anhaftenden Gefrierschutzmittels in die Mitte zwischen die zueinander gerichteten Auflageflächen der Präparatträgerplättchen gelegt und rasch mit einer feinen Pinzette in das Einfrierbad getaucht.

3.2.4 GEFRIERMITTEL

Als Einfrierbad diente Propan (-169°C), das mit Stickstoff verflüssigt wurde. Dazu wurde ein massiver Kupferzylinder mit oben liegender Bohrung in einem mit Flüssigstickstoff gefüllten Dewarbehälter gekühlt. In die Bohrung wurde Propangas geleitet und durch Kontakt mit dem Metall verflüssigt. Verfestigtes Propan wurde mit einem sauberen Metallstab von Zimmertemperatur geschmolzen (124).

3.2.5 PRÄPARATLAGERUNG

Die eingefrorenen Proben wurden jeweils einzeln in klebebandmarkierte Pasteurpipetten übertragen und in einem Flüssigstickstoffbehälter aufbewahrt. Eine Lagerungsdauer von 3 bis 8 Tagen ergab die höchste Quote an Brüchen durch das Gewebe. Durch die Lagerung löste sich auch anhaftendes, verfestigtes Propan von den

Trägerplättchen.

3.2.6 GEFRIERBRUCH

Es wurde die Doppelbruchmethode angewandt, mit der es möglich ist, beide Seiten des gebrochenen Gewebes mit Pt/C zu bedampfen und so komplementäre Replicas zu gewinnen (28, 35, 108, 183).

Der Probenraum der Gefrierätzanlage BA 360 M (Balzers) wurde auf $\leq 5 \times 10^{-6}$ Torr evakuiert. Der Probenstisch und der schwenkbare Messerarm wurden auf ca. -150°C gekühlt.

Die zwischen den Präparatsträgerplättchen montierten Proben wurden unter Flüssigstickstoff in den Doppelbruchblock eingefügt und nach Belüftung des Probenraumes mit trockenem Stickstoffgas über eine Schnellwechselschleuse auf dem Probenstisch fixiert. Nach erneuter Evakuierung des Probenraumes auf $\leq 2 \times 10^{-6}$ Torr, wurde die Probenstichtemperatur durch Drosselung der N_2 -Zufuhr auf -105°C angehoben. Diese Temperatur bestand zum Temperatúrausgleich der Proben für jeweils mindestens 5 Minuten. Danach wurde der Doppelbruchblock mit dem N_2 -gekühlten Schwenkmesser geöffnet und sofort mit der Pt/C-Bedampfung begonnen. Es wurde nicht geätzt.

3.2.7 Pt/C-BESCHATTUNG

Die Bedampfung der Proben mit Platin erfolgte aus einer Elektronenstrahlverdampfungseinrichtung EVM 052 (Balzers). Die Bedampfungsspannung war ca. 1800 V, der Bedampfungsstrom 80 mA. Es wurde immer unter einem Winkel von 45° bedampft. Die Dicke der auf die Probe aufgedampften Pt-Schicht wurde über die Frequenzänderung eines neben dem Bruchstisch montierten Schwingquarzes ermittelt (111). Dieser Schwingquarz wurde ebenfalls von der Platinschicht bedeckt und änderte seine Frequenz in linearer Abhängigkeit von der Dicke der aufgedampften Metallschicht. Die Frequenzänderung wurde mit einem Kompensationsschreiber Servogor RE 511 in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet.

Angestrebt wurde eine Aufdampfdicke von ca. 27 Å, die nach der Eichkurve des Schwingquarzes einer Frequenzänderung von 230 Hz entspricht (Abb. 3).

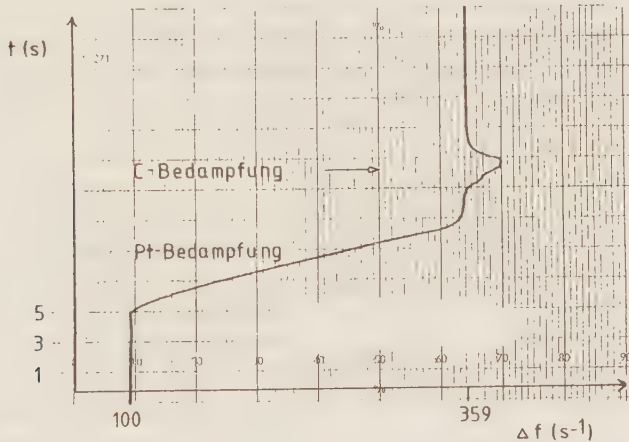


Abb. 3: Bedampfungsprotokoll; Abszisse: Frequenzänderung (Hz),
Ordinate: Zeit (s).

Die unmittelbar anschließende Kohlebedampfung zur mechanischen Festigung der Pt-Replica wurde mit einem Kohle-Widerstandsverdampfer durchgeführt. Nach empirischen Werten wurde ca. 7 s mit einer Spannung von 100–120 V bedampft. Der Kohleaufdampfwinkel war 90° . Eine direkte Dickenmessung der aufgetragenen Kohleschicht war nicht möglich. Nach Firmenangaben (Betriebsanleitung BB 800048 BD, Balzers) beträgt die aufgetragene Kohleschicht etwa 25 Å je Sekunde Bedampfungszeit. Damit betrug die Dicke der Kohleschicht etwa 150 Å. Die Korngröße der Pt-Schicht beträgt ca. 20–30 Å (158).

3.2.8 ABFLOTTIEREN DER PROBEN

Die Präparatträgerplättchen mit den beschatteten Gewebestückchen wurden auf Filterpapier möglichst langsam aufgetaut. Sie wurden unverzüglich unter dem Stereomikroskop in ein mit H_2O bidest. bis fast zum Rand gefülltes, enghalsiges Schnappdeckelgläschen vorsichtig schräg eingebracht. Dabei löste sich das bedampfte Gewebe vom Kupferplättchen. Das Gewebe schwamm auf der Wasseroberfläche und konnte mit einer kleinen Platinöse aufgenommen werden.

3.2.9 REINIGUNG DER REPLICA

Die Reinigung der Replica von dem sehr fest haftenden Gewebe wurde mit ca. 70 % H_2SO_4 in 2-3 Tagen erreicht. Eine längere Einwirkzeit der Säure führte zu zunehmender Zerstörung der Replica. Die Verwendung enghalsiger Schnappdeckelgläschen ergab eine große Zahl zusammenhängender Replica. Möglicherweise waren die Replica durch die ruhige Lage im tiefsten Punkt des Flüssigkeitsmeniskus vor mechanischer Belastung geschützt. Dadurch konnten die Verluste an Replica, die bei diesem Präparationsschritt besonders groß sind, bedeutend reduziert werden.

Die Gläschen wurden wegen der hygroskopischen Wirkung der Schwefelsäure dicht mit Parafilm verschlossen. Nach Entnahme aus dem Säurebad wurden die Replica mit einer Platinöse auf H_2O bidest. aufgebracht und so von anhaftender H_2SO_4 gereinigt.

3.2.10 AUFBRINGEN DER REPLICA AUF KUPFERGRIDS

Die gereinigten Replicas wurden von der Wasseroberfläche durch senkrechtes Auftupfen auf unbehandelte Kupfergrids von 400 mesh gewonnen. Mitaufgenommenes Wasser wurde vorsichtig mit Filterpapier seitlich abgezogen. Eine möglichst zentrale Lage der Replica auf dem Grid erleichterte die Elektronenmikroskopie wesentlich.

3.2.11 ELEKTRONENMIKROSKOPIE

Die Elektronenmikroskopie wurde auf einem Jeol-JEM 100 CX bei einer Spannung von 100 kV und einem Kathodenstrom von 100 μ A durchgeführt. Es wurden in allen Gewebeschnitten sämtliche sichtbaren TJ-Zonen photographiert.

Aus langen Bürstensäumen wurden zufällig ausgewählte Abschnitte photographiert. Dadurch sollte eine Vorauswahl "typisch gesunder" bzw. "typisch kranker" Gewebezonen für die quantitative Auswertung vermieden werden.

Es wurde besonders darauf geachtet, von jedem Patienten Negative aus möglichst vielen verschiedenen Gewebescheiben zu erhalten. Da die Höhe der Gewebescheiben im Mukosaniveau immer unterschiedlich war und eine zufällige Bruchlinie im Gewebe angenommen werden kann, waren damit Negative von verschiedenen Stellen einer Gewebezone (Zotte, Krypte) zu gewinnen.

Photographiert wurde mit Agfa Scientia Film von Agfa Gevaert bei einer Empfindlichkeit von Stufe "9" mit 0,7 s Belichtungszeit. Die geeignetste Vergrößerung war 10000-fach. Die Negative wurden mit Eukobrom von Tetenal 4 min in der empfohlenen 1:10 Verdünnung entwickelt.

3.2.12 QUANTITATIVE MORPHOMETRIE

Die quantitative Erfassung der photographierten Membranfeinstrukturen - Tight junctions, Intramembranpartikel, Mikrovilli - wurde mit einem Leitz-A.S.M.-Bildanalyse-System durchgeführt (26). Dazu wurden die elektronenmikroskopischen Negative von einem Diaprojektor Prado Universal über einen Spiegel auf die Meßfläche des Bildanalyse-Systems projiziert.

Die Gesamtvergrößerung des projizierten Negatives wurde in folgender Weise berechnet: Es wurde vor jeder Meßserie ein Eichnegativ mit Meßskala in gleicher Weise vergrößert und der Vergrößerungsfaktor durch den Diaprojektor ermittelt. Dazu wurde ein

vergrößerter Maßstab dreimal gemessen und der Mittelwert gebildet. Dieser Vergrößerungsfaktor wurde mit der auf dem Negativ vermerkten Vergrößerung durch das Elektronenmikroskop multipliziert und in das A.S.M.-Bildanalyssystem einprogrammiert.

Die Länge der zu messenden Strukturen wurde durch langsames Nachfahren mit einem Meßstift bestimmt. Es konnten bis zu 6 verschiedene Parameter nebeneinander bestimmt werden.

Die Meßergebnisse (in μm) einer Meßreihe (Photos nur aus dem Replica eines Gewebescheibchens) wurden jeweils als Urliste mit einem Model 700 Printer von Centronics ausgedruckt. Nach Eingabe passender Klassen wurden immer auch die Histogramme der gemessenen Parameter, sowie Mittelwert und Standardabweichung ausgedruckt.

Folgende 6 Parameter wurden bestimmt:

1. Messung der TJ-Tiefe der PF-Seite.

Dazu wurden Schablonen angefertigt, die - berechnet für jede Endvergrößerung des Negativs - eine in konstanten Abständen von $0,4 \mu\text{m}$ geteilte Gerade zeigten. Diese wurden auf dem Meßtisch dem projizierten Bild unterlegt, sodaß das TJ-Band von den Loten auf die Gerade jeweils alle $0,4 \mu\text{m}$ "geschnitten" wurde. Die Gerade wurde durch die Fusspunkte der Mikrovilli gelegt. Die auf einem Lot liegende Gesamttiefe der Tight junction wurde gemessen.

Die Kippung der Replicas wurde nicht korrigiert. Es muß daher berücksichtigt werden, daß die reale TJ-Tiefe höher liegt als die erhaltenen Meßwerte.

Gleichzeitig wurden alle durch das Lot getroffenen TJ-Leisten (PF-Seite) gezählt und dokumentiert. TJ mit einer Gesamtlänge unter $0,4 \mu\text{m}$ wurden in der Mitte gemessen. Die TJ-Breite in der Nähe der Triple-TJ wurde nicht berücksichtigt. Die Gesamtlänge der gemessenen PF-TJ jedes Negatives wurde ebenfalls gemessen.

Die Klassenbreite betrug $0,05 \mu\text{m}$.

2. Messung der TJ-Tiefe der EF-Seite.

Ebenso wie bei der Messung der PF-Seite wurden alle von einem Lot getroffenen Furchen der EF-Seite gezählt, die Gesamtlänge der EF-TJ wurde gemessen.

Die Klassenbreite betrug 0,05 μm .

3. Messung aberrierender TJ-Elemente der PF- und EF-Seite.

Alle TJ-Elemente, die nicht mit beiden Enden in das TJ-Netz verknüpft waren, d.h. vom unteren Ende der TJ ohne Verknüpfung von der untersten TJ-Leiste auf der Membran nach basal gezogen bzw. einzeln unter dem TJ-Netz lagen, wurden in ihrer gesamten Länge gemessen. Es wurde nicht nach PF- und EF-Seiten unterschieden. Die Einzellängen dieser aberrierenden Stränge wurden addiert. Als Bezugsstandard diente die Gesamtlänge der zugehörigen PF- und EF-Netze.

4. Messung der Mikrovilluslänge.

In jedem Negativ wurden alle vollständig abgebildeten Mikrovilli entlang ihrer Mitte von der Basis bis zu ihrer äußersten Spitze gemessen. Gebüschelte Mikrovilli wurden immer von der Spitze bis zum Verästelungspunkt gemessen.

Die Klassenbreite betrug 0,1 μm .

5. Messung des Mikrovillusdurchmessers.

Abgebrochene Mikrovilli zeigen eine als ovale Fläche erscheinende Bruchstelle. Lag diese ovale Bruchstelle etwa in der Mitte des Mikrovillus, so wurde der Querdurchmesser der Bruchstelle als Dicke des Mikrovillus bestimmt.

Die Klassenbreite war 0,025 μm .

6. Messung der Triple-TJ-Länge.

Die Länge der Triple-TJ, einer an der Kontaktstelle dreier Zellen leiterartig von der TJ in die Tiefe ziehenden TJ-Formation, wurde

gemessen. Dabei wurde als Länge der Triple-TJ die Entfernung zwischen dem obersten Strang der Zonula occludens und dem untersten Ende der Triple-TJ-Leisten definiert.

Die Klassenbreite war $0,1 \mu\text{m}$.

Bestimmung der Anzahl an Intramembranpartikeln.

Zur Bestimmung einer Probefläche wurde ein gezeichnetes Rechteck als Schablone verwendet. Mit einem Meßprojektor wurden die Seiten des Rechtecks zu $9,462 \text{ mm}$ und $4,650 \text{ mm}$ bestimmt (Mittelwerte aus drei Messungen). Die Innenfläche betrug damit $44,0 \text{ mm}^2$. Die Schablone wurde der Mitte gut abgebildeter Mikrovillusmembranen unterlegt und die Zahl der Partikel in der Probefläche bestimmt. Für jede Endvergrößerung des Negativs wurde ein Faktor errechnet und damit die Anzahl der Partikel pro μm^2 Mikrovillusmembranfläche ermittelt.

Die Auswertung wurde getrennt nach PF- und EF-Seiten an zufällig ausgewählten Mikrovilli durchgeführt. Mikrovilli von Becherzellen und nicht identifizierbarer Zellen wurden nicht ausgewertet.

Bestimmung der Mikrovillushäufigkeit

In einem getrennten Auswertungsgang wurde die Mikrovillusdichte der Zelloberfläche bestimmt. Dazu wurde von jedem Negativ, das nach den oben beschriebenen Komponenten ausgewertet worden war, die Gesamtlänge der photographierten Gewebebruchlinie gemessen. Es wurde ein näherungsweise gerader Verlauf der Bruchlinie durch das Gewebe vorausgesetzt. Diese Messung erfolgte ohne Nachvergrößerung des Negativs durch den Projektor; die Negative wurden direkt auf dem Meßtisch des A.S.M.-Bildanalysesystems erfasst.

Unter Lupenvergrößerung wurden daraufhin alle Mikrovilli, die von dieser Gewebebruchlinie getroffen worden waren, gezählt. Dabei war es bedeutungslos, ob die Mikrovilli in ganzer Breite oder nur durch Bruchteile der Mikrovillusbasis zu erkennen waren.

Becherzellen wurden nicht berücksichtigt.

Für jedes einzelne Negativ wurde aus diesen Meßwerten der Quotient "Mikrovilli/ μm Bruchlinie" ermittelt.

Gleichzeitig wurde die Anzahl "abnormer" Mikrovilli ermittelt. Hierzu wurden bei verzweigten, gegabelten oder gebüschelten Mikrovilli die Zahl der Spitzen erfasst. Dies bedeutet, daß z.B. ein gegabelter Mikrovillus als 2 abnorme Mikrovilli gezählt wurde. Die Zahl abnormer Mikrovilli einer Gewebezone eines Patienten wurde zur Gesamtzahl aller, über der ganzen Gewebebruchlinie gezählten Mikrovilli in Beziehung gesetzt und durch den Quotienten "abnorme Mikrovilli/100 Mikrovilli" in Prozent ausgedrückt.

Für jedes elektronenmikroskopische Negativ wurde ein Formblatt angelegt, in dem die Ergebnisse der Zählungen dokumentiert wurden (Abb. 4).

PAT	EBENE/GRID	VERGR	ASM	EMI			BLATT																	
①	PF	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	N	s	
	ST																							
	EF																						N	s
	ST																							
PF: TJ-BR=		[μ]		s=		[μ]		EF TJ-BR=		[μ]		s=		[μ]										
TJ-GES LÄNGE		PF		[μ]		EF		[μ]																
ABER. STR.		[μ]		LÜCKEN-		PF		[μ]						GAP-J										
BESCHR.				TJ BESCHR																				
3-ZELL-TJ:																								
④	LÄNGE [μ]	L:		s=		n=																		
	DURCHM. [μ]	D:		s=		n=																		
GES. BRUCHL. MV:		[μ]		n=		MV		[μ]																
ABN. MV n				BESCHR.																				
IMP																								
	PF	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13							n	s	$\frac{n}{n+1}$	
	EF																							
FLÄCHE PR. FELD:		[nm^2]		FAKTOR																				
BEM.				KOMPL.		☐		POSITIV		☐														

Abb. 4: Formblatt zur Dokumentation von Meßdaten

Alle unter Parameter 1-6 aufgeführten Längenmeßdaten wurden für die maschinelle statistische Auswertung auf Datendisketten aufgezeichnet.

3.2.13 MORPHOMETRISCHE AUSWERTUNG HISTOLOGISCHER SCHNITTE

Zur Kontrolle der klinischen Diagnose eines jeden Patienten wurden histologische Schnitte quantitativ untersucht.

Aus den HE-gefärbten Serienschnitten wurden in möglichst gleichen Abständen je ca. 6 Schnitte pro Patient ausgewählt. Diese wurden am inversen Mikroskop IM 35 der Fa. Zeiss mit einer Kamera Contax RTS mit Contax Data Back auf Agfapan 100 professional SW-Film photographiert. Durch Photographieren einer Lupenskala mit den beiden verwendeten Objektivvergrößerungen und anschließendem Ausmessen dieser Eichnegative mit der gleichen Lupenskala wurde die Vergrößerung durch Kamera und Mikroskop bestimmt.

Die Auswertung der histologischen Photos erfolgte wiederum mit dem A.S.M.-Bildanalysesystem mit angebauter Projektionseinrichtung. Die Multiplikation der photographischen Vergrößerung mit dem Vergrößerungsfaktor des Projektors ergab die einprogrammierte Gesamtvergrößerung. Im histologischen Schnitt wurden folgende Parameter vermessen:

1. Die **Zottenlänge** wurde in jedem Zottenanschnitt vom Zottenursprung bis zur äußersten Spitze entlang der Mitte des Villus gemessen.
2. Die **Zottenbreite** wurde am Ursprung jeder Zotte bestimmt.
3. Die **Kryptenlänge** wurde von der Höhe der Kryptenöffnung bis zur Basalmembran der Zellen am Kryptengrund gemessen. Sie wurde entlang der Mitte der Krypte bestimmt. Es wurden nur Kryptenschnitte mit deutlicher Darstellung der gesamten Krypte (vom

Kryptenmund bis zum gerundeten Kryptenboden) erfasst.

4. Der **Kryptendurchmesser** wurde in mittlerer Höhe der Krypte bestimmt und beinhaltete die Höhe des Epithels zu beiden Seiten des Kryptenquerschnitts.

5. Die **Mukosadicke** wurde mit einer Schablone bestimmt. Dabei lag die Grundlinie der Schablone parallel zur Oberfläche des histologischen Schnittes, die Lote auf diese Grundlinie "schnitten" das Gewebe jeweils in 290 μm Entfernung senkrecht zur Oberfläche. Die Mukosadicke reichte immer vom obersten Schnittpunkt des Lotes mit den Zotten- bzw. Oberflächenzellen bis zum Beginn der Muscularis mucosae.

Diese histologischen Daten wurden für die statistische Auswertung, nach Patienten getrennt, auf Datendisketten aufgezeichnet.

3.2.14 MASCHINELLE DATENSAMMLUNG UND AUSWERTUNG

Die mit dem Leitz-A.S.M.-Bildanalysesystem erhobenen Daten wurden, nach einzelnen Replica getrennt, von einem Model 700 Printer (Centronics, Hudson, USA) als Urliste erhalten. Nach Eingabe geeigneter Klassenbreiten wurden die einzelnen Parameter in Histogramme geordnet und ausgedruckt. Anschließend wurden die Daten auf einen Tischrechner alpha-Tronic TA/P2 übertragen und auf Datendisketten aufgezeichnet. Es wurde der Interpreter FOKO 3.01 verwendet.

Eine Datei bestand aus sämtlichen Meßdaten aller ausgewerteter Negative einer Replica.

Die Daten waren in Zweierblocks organisiert. Die erste Zeile dieses Blocks enthielt die Parameternummer ("Erkennungssequenz"), die zweite Zeile den Meßwert (in mm).

3.2.14.1 KORREKTUR VON EINLESEFEHLERN

Beim Ausmessen der Negative wurden durch Gerätefehler oder durch Zuordnung der Meßwerte zu falschen Komponenten einige fehlerhafte Meßwerte in die Dateien aufgenommen. Zur Eliminierung dieser Werte wurde ein einfaches Korrekturprogramm entwickelt (siehe Anhang 1).

Es erlaubt, falsche Einzeldaten aus sequentiellen Dateien zu verändern. Dazu wird die Datei in den Speicher übernommen und die Zeilennummer des falschen Meßwertes in der Datei ermittelt. Mit dem Befehl "A\$(Zeilennummer) = "11, 123456789012" wird der falsche Wert überschrieben. Nach Beendigung der Korrektur aller falscher Daten wird die geänderte Datei durch Eingabe von "CONT" vom Speicher auf die Diskette an die Stelle der alten Datei übertragen.

Die eingefügte 12-stellige Zahl wird durch das Statistikprogramm (siehe Zeile 730) nicht in den Rechengang aufgenommen.

3.2.14.2 STATISTIKPROGRAMM

Zur statistischen Auswertung der Dateien von insgesamt 4 Disketten wurde ein Basicprogramm (siehe Anhang 2) entwickelt.

Der obengenannte Zweierblock, in dem die Meßdaten organisiert waren, hatte z.B. folgendes Aussehen:

10,...2.00000 (Erkennungszeile)

11,...0.239343E-03 (Meßwert)

Die Erkennungssequenz enthielt die Parameternummer (im obigen Beispiel 2 = TJ-EF-Tiefe; Meßwert = 239,343 nm).

Mit dem Statistikprogramm war es möglich, jeweils einen Parameter aus beliebig kombinierten Dateien (z.B. alle MV-Längen aller Kryptenschichten aller Zöliakiekranker) statistisch zu bearbeiten. Es wurden bei jedem Patienten alle Parameter einzeln und ebenso alle Parameter für die Gruppen "Gesunde" und "Kranke"

berechnet.

Nachdem alle betreffenden Meßwerte von den Disketten in den Speicher übernommen worden waren, wurden jeweils schrittweise Mittelwert, Varianz und Standardabweichung berechnet und mit der Datenanzahl N und dem zuletzt in die Rechnung einbezogenen N -ten Meßwert ausgedruckt. Dadurch war es möglich, die Entwicklung des Mittelwertes, der Standardabweichung und der Varianz mit steigender Anzahl von Meßdaten zu verfolgen.

Um abschätzen zu können, wieviele Einzelwerte eines gemessenen Parameters zur sicheren Mittelwertbestimmung erforderlich sind, wurden Mittelwerte bzw. Standardabweichung in Abhängigkeit von der Anzahl der Meßpunkte N untersucht. Als ausreichend wurde die Zahl der Meßwerte dann angenommen, wenn nach Zugabe weiterer Dateien der Mittelwert bzw. die Standardabweichung nur noch in engen Grenzen schwankten.

Zum Ausdruck der Daten wurde ein Drucker DRH 80 GAD 201 von Triumph-Adler/Nürnberg benutzt.

3.2.15 STATISTISCHE AUSWERTUNG NICHT MASCHINELL ERFASSBARER DATEN

Einige Parameter konnten nicht mit dem A.S.M.-Bildanalysesystem erfasst werden. Dazu gehörten die Zählung der TJ-Elemente auf der PF- und EF-Seite, die Anzahl der Mikrovilli/um Bruchlinie und die Zahl der IMP auf der PF- und EF-Seite.

Diese Daten wurden für jeden einzelnen Patienten und für die beiden untersuchten Gruppen, getrennt nach Kryptenzellen und absorptiven Zellen, zusammengefasst.

Mit dem Statistikprogramm des Taschenrechners TI-55-II von Texas Instruments, wurden Mittelwert, Standardabweichung und Varianz bestimmt.

Der Variationskoeffizient V_k wurde als der prozentuale Anteil der Standardabweichung vom Mittelwert berechnet.

3.2.16 STANDARDISIERUNG GEMESSENER GRÖSSEN

Die **Gesamtlänge aberrierender TJ-Elemente** wurde auf die Gesamtlänge der erfassten TJ-Bänder der PF- und EF-Seiten bezogen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde der Quotient "Aberrierende TJ-Elemente (μm)/100 μm TJ-Gesamtlänge" gebildet.

Der Quotient "**Mikrovilluslänge/Mikrovillusdicke**" wurde durch Division der Mittelwerte beider Komponenten aus dem beobachteten Kollektiv gewonnen.

Die **Dichte des Mikrovillusbestandes** auf der Oberfläche einer Epithelzelle ($\text{MV}/\mu\text{m}^2$) wurde durch das Quadrat der Anzahl Mikrovilli je 1 μm Gewebebruchlinie erhalten. Quadriert wurde der Quotient aus allen Mikrovilli eines Kollektivs und der Gesamtbruchlänge.

Die **Anzahl abnormer Mikrovilli** (in %) wurde als Verhältnis abnormer Mikrovilli im Verhältnis zu allen (normalen und abnormen) Mikrovilli eines Kollektivs berechnet.

Aus der durchschnittlichen TJ-Tiefe und der durchschnittlichen Anzahl der TJ-Elemente wurde als Maß für den "Vernetzungsgrad" der TJ eine **durchschnittliche "Maschenweite Mw"** der TJ berechnet. Dabei ist

$$Mw = \frac{a - n b}{n - 1}$$

a = TJ-Tiefe
 b = Breite der TJ-Leiste
 n = Anzahl der TJ-Elemente

Dies ergibt eine hypothetische, durchschnittliche lichte Weite zwischen den TJ-Elementen. Der Wert 8,5 nm (185) entspricht der Breite einer TJ-Leiste. Selbst durchgeführte, orientierende Messungen ergaben eine Leistenbreite von 8,3 nm.

Bei Auswertung der lichtmikroskopischen Präparate wurde der

Quotient "Zottenlänge/Zottenbreite" für jeden normalen Patienten gebildet.

3.2.17 STATISTISCHE TESTS

Um Unterschiede in den Mittelwerten beim Vergleich der einzelnen Feinstrukturen auf statistische Signifikanz zu prüfen, wurde der t-Test für unabhängige Größen nach Student bzw. der Chi-Quadrat-test (76) angewandt.

3.2.18 RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Prof. Y. Ben-Shaul, G.S. Wise Life Sciences Center, Tel Aviv University, Israel angefertigt.

Die Gewebeproben wurden gewonnen und fixiert wie unter 3.1.2 beschrieben.

Zur Präparation für die Rasterelektronenmikroskopie wurden die Biopsieproben in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, am kritischen Punkt getrocknet und mit Au/C beschattet.

Die Elektronenmikroskopie erfolgte an einem JEOL JSM-35 C Rasterelektronenmikroskop.

4. EXPERIMENTELLE ERGEBNISSE

Die elektronenmikroskopische Darstellung von Zellmembranen war bis Anfang der sechziger Jahre der Dünnschnittelektronenmikroskopie vorbehalten. Mit der von Moor et al. (106) entwickelten Gefrierbruchtechnik (75, 192) ist es seitdem möglich, flächige Abbildungen von Zellmembranen zu erhalten. Dabei brechen die gefrorenen Membranen - der Zone geringster mechanischer Festigkeit folgend - entlang ihrer hydrophoben Mitte und enthüllen damit intramembranär gelegene Strukturen (22). Die Darstellung der möglichen Membranbruchflächen und deren Nomenklatur ist aus Abb. 5 ersichtlich.

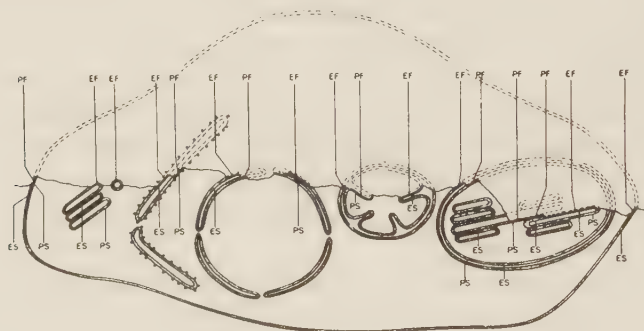


Abb. 5: Nomenklatur der Membranbruchflächen an gefriergebrochenem Gewebe (nach (21)).

Neben den regellos verteilten intramembranären Partikeln (IMP) werden besonders die interzellulären Junctions damit der morphologischen Untersuchung zugänglich. Gut darstellbar sind Gap junctions als eng gepackte Partikel der lateralen Zellmembran und Tight junctions als gürtelförmig den apikalen Zellpol umspannen.

des Netzwerk.

TJ stellen sich in unterschiedlichen Epithelien - entsprechend ihrer Funktion als parazelluläre Permeabilitätsbarriere und Regulator des parazellulären Ionenflusses - in sehr variabler Ausdehnung, Komplexität und Anordnung dar (45).

Bei der Zöliakie kommt es aufgrund der Unverträglichkeit des in Getreideeiweiß enthaltenen Glutens zu schweren morphologischen Schäden des Epithels des menschlichen Dünndarms. Die Veränderung der Mukosaarchitektur mit Zottenschwund, Kryptenverlängerung sowie die Schädigung der absorptiven Epithelzellen führen zu einem schweren Malabsorptionssyndrom (29).

Klinische Befunde wie Serumantikörper gegen Gliadin und andere Proteine aus Nahrungsmitteln deuten auf eine erhöhte Permeabilität des geschädigten Epithels für große Moleküle hin. Eine mögliche Ursache könnte in einer Degradierung der TJ der Dünndarmepithelzellen bestehen.

Madara et al. fanden die TJ-Tiefe und die Anzahl der TJ-Elemente zwischen den Jejunumepithelzellen bei erwachsenen Zöliakiepatienten vermindert; strukturelle Schäden der TJ-Elemente wurden vermutet (85). Allerdings basiert Ihre Untersuchung auf einer kleinen Zahl ausgewerteter TJ-Bilder.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte die Veränderung intramembranärer Strukturen (TJ, IMP) sowie das Ausmaß der Schädigung des Bürstensaumes der Jejunumepithelzellen bei florider Zöliakie des Kindesalters untersucht werden.

Dazu wurden im Rahmen der Klinikdiagnostik gewonnene Mukosabiopsien von 5 zöliakiekranken Kindern und 5 histologisch normalen Kindern mit Indikation zur gastrointestinalen Untersuchung zur Gefrierbruchelektronenmikroskopie verwendet. Die Jejunumbiopsien wurden sofort nach der Entnahme in Glutaraldehyd fixiert und

nach lichtmikroskopischen Kriterien und klinischen Befunden in 2 Gruppen eingeteilt: normale, histologisch unauffällige Mukosa (normale Kontrollen) und flache Mukosa (Zöliakie).

Tabelle 1: Biographische Daten der untersuchten Patienten

<u>PAT.NR.</u>	<u>ALTER</u> ¹	<u>GESCHLECHT</u>	<u>GLUTENBELASTUNG</u> ²	<u>ALTER BEI</u> <u>STELLUNG</u> ¹	<u>DIAGNOSE-</u>
----------------	---------------------------	-------------------	-------------------------------------	--	------------------

Zöliakie:

1	5	m	12		3
2	5	m	30		1
3	1,5	w	3		1,5
4	10	w	30		3
5	3	w	24		1

Normale Kontrollen:

6	3	m	1		
7	10	w	30		
8	3	m	8		
9	4	w	30		
10	5	w	30		

¹Alter in Jahren ²Glutenbelastung in Monaten

Das Durchschnittsalter der zöliakiekranken Kinder betrug $4,9 \pm 2,1$ Jahre, das der normalen Kinder $5,0 \pm 2,0$ Jahre. Jede Gruppe enthielt 3 Mädchen und 2 Buben. Keines der Kinder stand unter glutenfreier Diät.

Tabelle 2: Klinische Daten der untersuchten Patienten

Pat.nr.	LIF		HLA	B ₁₂ pg/ml	Folat ng/ml	IgA mg/100 ml	Ferritin ng/ml
	B ₂	B ₃					
Zöliakie:							
1	0 %	19 %	–	–	3,2	85	3
2	26 %	29 %	**	483	1,4	190	2
3	35 %	23 %	–	527	5,9	210	5
4	19 %	14 %	–	–	–	–	–
5	14 %	38 %	–	690	1,6	160	2

Kontrollen:

6	0 %	0 %	-	-	-	164	10
7	0 %	22 %	-	576	8,0	220	10
8	25 %	0 %	-	375	10,8	66	16
9	0 %	0 %	-	820	21,0	86	8
10	5 %	12 %	-	766	5,3	88	2

** A1, Aw 26, Bw 35, Bw 51, Bw 4, Bw 6, Cw 4, RR 4 5? 6?

- = nicht bestimmt

Normalbereiche: Ferritin > 10 ng/ml
 Folat > 4 ng/ml
 IgA 90 - 450 mg/100 ml
 B₁₂ 200 - 800 pg/ml

Um die klinische Diagnose überprüfen zu können, wurden histologische Schnitte der Mukosa jedes Patienten morphometrisch untersucht.

4.1 QUANTITATIVE AUSWERTUNG HISTOLOGISCHER MUKOSAPRÄPARATE

Dazu wurden Mukosaschnitte photographiert und mit dem Leitz-A.S.M-Bildanalysesystem vermessen. Die erfassten Parameter - Zottenlänge- und breite, Kryptenlänge- und durchmesser und Mukosadiecke - wurden mit dem Statistikprogramm für jeden Patienten einzeln und zusammengefasst nach Zöliakiepatienten und Kontrollen verrechnet.

4.1.1 ZOTTENLÄNGE

Die Messung der Zottenlänge Gesunder erwies sich als schwierig, da die Mukosa in den vorliegenden Serienschnitten nicht immer parallel zur Zottenlängsachse, sondern häufig schräg geschnitten erschien. Daher dürfte die gemessene Zottenlänge unter der tatsächlichen Zottenlänge liegen.

Insgesamt wurden 182 Zottenlängsschnitte gemessen. Dabei ergab sich ein Mittelwert von $331,8 \mu\text{m} \pm 92,9 \mu\text{m}$. Die Mittelwerte der einzelnen Patienten reichten von $220,6 \mu\text{m}$ bis $394,7 \mu\text{m}$.

4.1.2 ZOTTENBREITE

Die Breite der Zotte wurde an ihrer Basis gemessen. Es wurden 138 Messungen vorgenommen, dabei ergab sich eine durchschnittliche Zottenbreite von $149,7 \mu\text{m} \pm 45,0 \mu\text{m}$.

4.1.3 ZOTTENLÄNGE/ZOTTENBREITE

Das Verhältnis von Zottenlänge zu Zottenbreite war im Durchschnitt 2,22. Die Werte reichten bei den einzelnen Patienten von 1,52 bis 2,93. Dieser höchste Wert stammt aus einem Mukosapräparat, das parallel zur Zottenlängsachse geschnitten worden war (Abb. 6).



Abb. 6: Normale Mukosa (480 x).

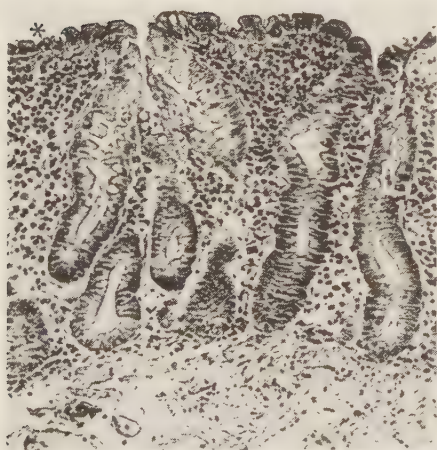


Abb. 7, 8: Zöliakie, flache Mukosa, elongierte Krypten, degradierte Epithelzellen*, dichte Infiltration der Lamina propria (480 x).

4.1.4 KRYPTENLÄNGE

Die Längenausdehnung wurde nur an Krypten gemessen, die in ganzer Länge erkennbar waren. In den Präparaten der Patienten mit Zöliakie waren 97, in denen Normaler 117 Krypten meßbar. Daraus ergaben sich folgende Mittelwerte:

Zöliakie $393,8 \mu\text{m} \pm 56,6 \mu\text{m}$

Kontrollen $158,4 \mu\text{m} \pm 47,8 \mu\text{m}$

Die Mittelwerte der einzelnen Patienten schwankten bei Zöliakie von $343,5 \mu\text{m}$ bis $430,1 \mu\text{m}$, in der Kontrollgruppe von $119,0 \mu\text{m}$ bis $239,5 \mu\text{m}$. Die Krypten waren damit bei Zöliakie um den Faktor 2,5 verlängert (Abb. 7).

Die Mittelwerte der Kryptenlängen erwiesen sich mit $p \leq 0,001$ als statistisch signifikant verschieden.

4.1.5 KRYPTENDURCHMESSER

Die Messung des Kryptendurchmessers wurde in der Mitte der Krypte vorgenommen. Es wurden bei Zöliakie 153, in der Kontrollgruppe 142 Krypten gemessen. Die Mittelwerte waren:

Zöliakie $68,9 \mu\text{m} \pm 13,0 \mu\text{m}$

Kontrollen $56,8 \mu\text{m} \pm 12,7 \mu\text{m}$

Damit waren die Kryptendurchmesser - bei nahezu gleicher Standardabweichung - bei Zöliakie um $12,1 \mu\text{m}$ oder $21,3 \%$ breiter als die der Kontrollen. Dies stimmt mit der von Dittlmann (37) beobachteten Zunahme der mittleren Zellzahl pro Kryptenquerschnitt von 20 auf 26 Zellen in flacher Mukosa überein.

Statistisch waren die Unterschiede signifikant mit $p \leq 0,001$.

4.1.6 ZOTTENLÄNGE/KRYPTENLÄNGE

Als zuverlässiger diagnostischer Parameter für die Beurteilung der Mukosa gilt der Quotient aus Zottenlänge und Kryptenlänge. Hier ergab sich für die Normalfälle ein durchschnittlicher Quotient von $331,8 \mu\text{m}/158,4 \mu\text{m} = 2,09$. Damit besteht eine gute Übereinstimmung mit früheren morphometrischen Bestimmungen: 2,4 (37) und 2,2 (80).

4.1.7 MUKOSADICKE

Die Messung der Mukosadicke - vom absorbierenden Epithel zur Muscularis mucosae - erwies sich bei den Kontrollen als schwierig. Um eine mittlere Schleimhauthöhe zu erhalten, wurde die Strecke zwischen Epithel und Muscularis mucosae in konstanten Abständen gemessen. Damit ergibt sich bei häufigem Vorkommen hoher Zotten eine große mittlere Schleimhautdicke.

Bei normaler Mukosa ist eine hohe Standardabweichung zu erwarten, da der Schnittpunkt des Lotes mit dem Zottenepithel von der Zottenspitze bis zum Zottenursprung nahe der Kryptenöffnung reichen kann.

An der Mukosa Zöliakiekranker wurden 184, an der Mukosa normaler Patienten 213 Messungen durchgeführt. Es fanden sich folgende Mittelwerte:

Zöliakie $400,2 \mu\text{m} \pm 75,6 \mu\text{m}$

Kontrollen $355,5 \mu\text{m} \pm 113,8 \mu\text{m}$

Trotz des totalen Zottenverlustes kommt es zu einer enormen Verdickung der flachen Mukosa, die allein auf die stark elongierten Krypten (Abb. 8) zurückzuführen ist (Mittelwert der Kryptenlänge: $393,8 \mu\text{m}$). Die Mittelwerte der einzelnen Patienten reichten bei Zöliakie von $321,2 \mu\text{m}$ bis $466,4 \mu\text{m}$, in der Kontrollgruppe

von 274,9 μm bis 422,2 μm . Die Unterschiede der Mittelwerte waren mit $p \leq 0,001$ statistisch signifikant.

Die lichtmikroskopisch-morphometrischen Parameter der verwendeten Mukosabiopsien standen damit im Einklang mit Werten der Literatur (33, 37, 80). Die klinischen Angaben zur Diagnose konnten daher bestätigt werden.

Daraufhin wurde die Mukosa in Gewebeschichten geteilt, die nur absorbierendes Epithel bzw. Kryptenepithel enthielten.

Nach Inkubation mit Glycerin als Frostschutzmittel wurden diese eingefroren, im Hochvakuum gebrochen und mit Pt und C bedampft. Die Pt/C-Replica der Epithelzellmembranen wurden im Transmissionselektronenmikroskop untersucht, die Feinstrukturen (TJ, IMP) und die Bürstensäume in großer Zahl photographiert und morphometrisch ausgewertet.

4.2 STRUKTUR DER TIGHT JUNCTIONS

4.2.1 MESSUNG DER TIGHT JUNCTION TIEFE

Ohne Ausnahme wurden alle im Elektronenmikroskop gesehenen TJ photographiert. Während die Mehrzahl der TJ ein engvernetztes Mäaschenwerk aus unregelmäßigen Polygonen darstellte (Abb. 9), wurden vereinzelt auch TJ mit parallel zur apikalen Zelloberfläche verlaufenden TJ-Elementen gesehen. Auffällig veränderte TJ werden z.T. in der Krypte beobachtet: weitmaschige, wenig verzweigte TJ-Schleifen oder dicht beieinanderliegende, senkrecht zur Oberfläche orientierte TJ (Abb. 10).

Vereinzelt wurde bei Zöliakie auch ein deutlicher Wechsel in Tiefe und Komplexität der TJ von Zelle zu Zelle beobachtet (Abb. 11).

Die quantitative Auswertung erfolgte nur bei TJ, die in ihrer

ganzen Breite sichtbar waren. Durch "Schneiden" der TJ mit einem Lot in konstanten Abständen von $0,4\text{ }\mu\text{m}$ wurde ein möglichst objektiver Meßvorgang angestrebt. Die Auswertung der TJ-Tiefe wurde für die PF- und EF-Seite getrennt vorgenommen.

Insgesamt (PF + EF) wurden bei Zöliakie in der absorptiven Zellzone $241\text{ }\mu\text{m}$ und in der Kryptenzone $195\text{ }\mu\text{m}$ TJ-Bänder erfasst. Diese verteilten sich auf 98 (absorptive Zone) bzw. 95 (Kryptenzone) verschiedene Junctions.

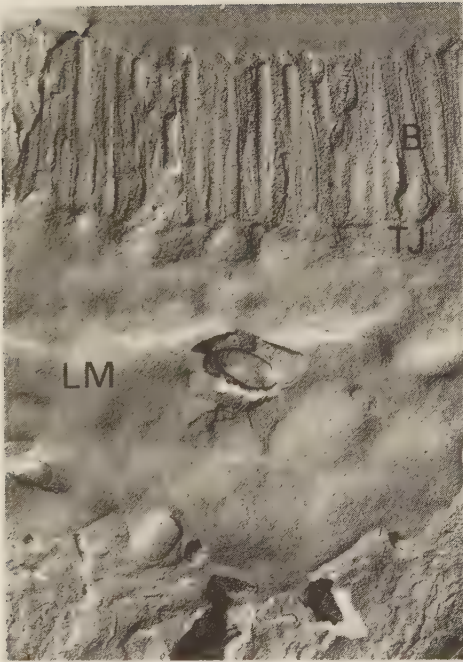
In normalem Gewebe wurden $121\text{ }\mu\text{m}$ TJ-Bänder in der Zottenzone und $119\text{ }\mu\text{m}$ in der Kryptenzone aufgenommen. Dies entspricht 66 (Zotten) bzw. 48 (Krypten) verschiedenen Junctions.

4.2.1.1 TJ-TIEFE DER PF-SEITE

Die PF-Seite der TJ war im allgemeinen gut identifizierbar. Das Erscheinungsbild der einzelnen TJ-Leiste reichte von einem kontinuierlichen, zylindrischen Strang bis hin zu einzelnen, kettenförmig hintereinanderliegenden Partikeln (Abb. 12). Am häufigsten waren jedoch Mischformen zu beobachten: Bezirke mit vereinzelt liegenden Partikeln wechselten mit durchgehenden Strängen bis zu etwa $0,2\text{ }\mu\text{m}$ Länge ab. Kontinuierliche Leisten fanden sich gehäuft an PF/EF-Übergängen.

Teilweise waren kurze PF-TJ-Leistenabschnitte zu sehen, die eine etwa doppelte Strangdicke gegenüber der normalen TJ-Leiste aufwiesen (Abb. 13).

TJ der PF-Seite konnten etwa 2-3 mal häufiger beobachtet werden als TJ der EF-Seite.

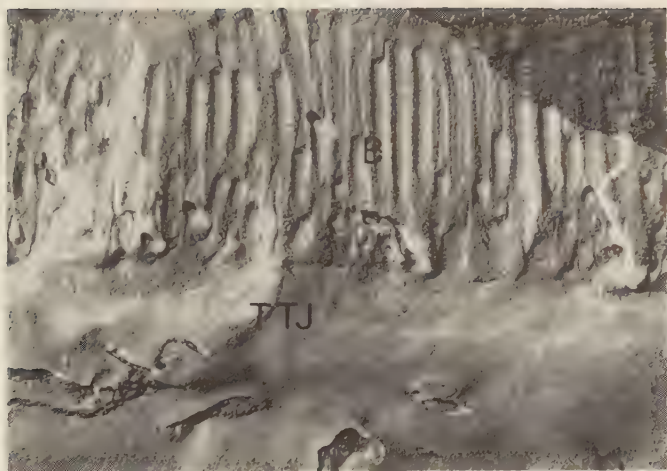


9

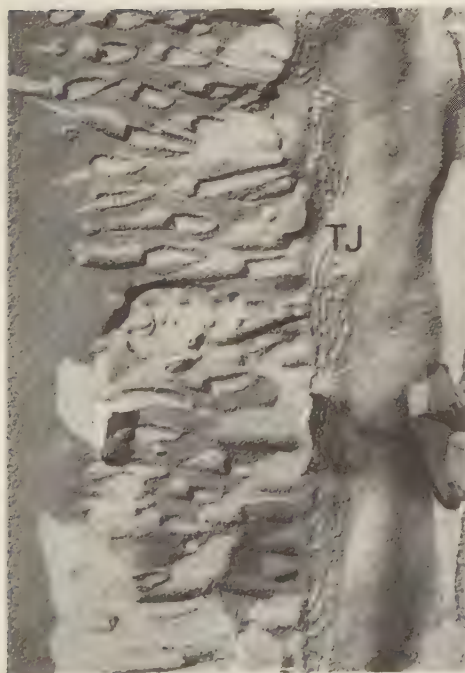


10

- Abb. 9: Normale Mukosa, absorptive Zellschicht, eng verknüpfte TJ von konstanter Tiefe, PF-Seite (26000 x).
- Abb. 10: Zöliakie, Kryptenepithel, weitmaschige PF-TJ, spärlicher Mikrovillusbesatz (27000 x).
- Abb. 11: Zöliakie, absorptive Zellschicht, Wechsel der TJ-Tiefe benachbarter Zellen, MV-Büschel, PF-Seite (25000 x).
- Abb. 12: Zöliakie, absorptive Zellschicht, schmales TJ-Band, PF-Seite. Die TJ-Fibrillen erscheinen als Partikelreihen (33000 x).
- Abb. 13: Normale Mukosa, absorptive Zellschicht, * = TJ-Fibrille mit doppelter Breite (84000 x).



11



12



13

Tabelle 3: ANZAHL DER MESSUNGEN DER TJ-PF-TIEFE

	Zöliakie	Kontrollen
Absorptive Zellschicht	426	179
Kryptenepithel	340	219

Dabei ergaben sich die folgenden Durchschnittswerte für die TJ-Tiefe der PF-Seite:

Tabelle 4: TJ-TIEFE DER PF-SEITE (nm)

	Zöliakie	Kontrollen
Absorptive Zellschicht	228,9 $\pm$ 79,2	244,1 $\pm$ 60,9
Kryptenepithel	274,0 $\pm$ 84,5	260,1 $\pm$ 72,0

Damit nimmt die durchschnittliche Tiefenausdehnung der TJ bei Gesunden um 16,0 nm und bei Zöliakiepatienten um 45,1 nm von der Krypte zu absorptiven Zellschicht hin ab. Die Abnahme der TJ-Tiefe von der Krypte zur Zotte war bei Normalen mit $p \leq 0,01$, bei flacher Mukosa mit $p \leq 0,001$ statistisch signifikant.

Die TJ-Breite ist bei Zöliakie im Oberflächenepithel um 15,2 nm (6,2 %) geringer als die der Kontrollgruppe, die TJ-Breite in der Kryptenzone um 13,9 nm (5,3 %) größer. Die Standardabweichung als Maß für die mittlere Abweichung der Meßwerte vom Mittelwert ist bei der Zöliakie in beiden Epithelzonen größer als bei der Kon-

trollserie. Der Unterschied der Standardabweichungen der absorbierenden Zellzone beträgt 18,3 nm (Zöliakie: + 30 %).

Während die Breite der TJ auf der PF-Seite der Membran im Oberflächenepithel bei Zöliakie geringer ist, weist die TJ-Breite stärkere Schwankungen auf als bei Gesunden. Die statistische Prüfung mit dem t-Test ergab, daß sich die Mittelwerte der TJ-PF-Tiefe zwischen flacher und normaler Mukosa sowohl in der Krypte als auch in der absorptiven Zellschicht mit $p \leq 0,025$ signifikant unterscheiden.

Im Histogramm der absorptiven Zellzonen zeigt sich, daß die TJ-Breite bei Zöliakie durchschnittlich geringer ist als bei den Kontrollen; die Kurve ist nach links verschoben. In der flachen Mukosa liegen ca. 1,9 % der Messungen zwischen 50 und 100 nm TJ-Breite und ca. 10,8 % zwischen 100 und 150 nm, gegenüber 0,6 % und 3,4 % bei der Kontrollserie (Abb. 14).

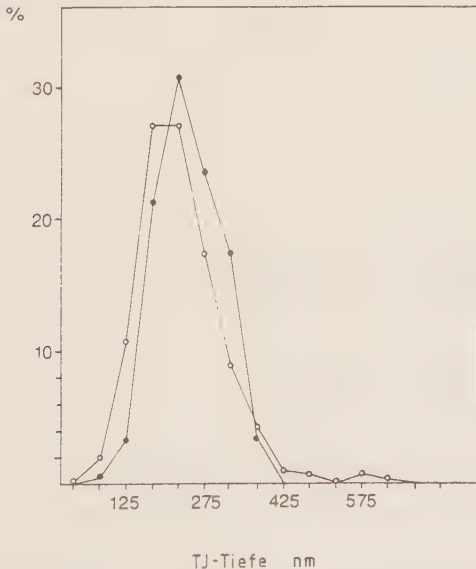


Abb. 14: TJ-Tiefe der absorptiven Zellschicht, PF-Seite.

○ = Zöliakie

● = Kontrolle

Die Histogramme der beiden Kryptenzonen zeigen nur geringe Unterschiede (Abb. 15).

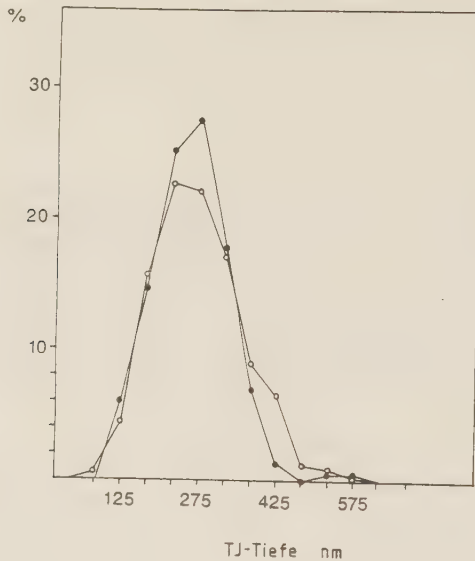


Abb. 15: TJ-Tiefe des Kryptenepithels, PF-Seite.

o = Zöliakie

● = Kontrolle

4.2.1.2 TJ-TIEFE DER EF-SEITE

Auf der EF-Seite erscheint die TJ nach Fixierung des Gewebes mit Glutaraldehyd als Netz aus Furchen, die zu den Leisten der PF-Seite komplementär sind (28).

Es sind daher etwa gleich viele EF- wie PF-TJ-Bänder im Gefrierbruch zu erwarten. Bei der Elektronenmikroskopie wurde die EF-Seite aber wesentlich weniger oft beobachtet. Dies mag darauf

beruhen, daß die EF-Furchen unter ungünstigen Beschattungswinkeln leicht von Pt ausgefüllt werden können und damit nicht mehr zu erkennen sind.

Selten wurden über eine größere Strecke hin leere Furchen beobachtet: überwiegend waren die EF-Furchen mit einzelnen Partikeln oder kurzen, zylindrischen Teilchen (Abb. 16) besetzt.

EF-Furchen mit doppelter oder größerer Breite wurden nicht beobachtet. Unterbrochene EF-Furchen wurden ebenfalls nicht gesehen (41).

Die Zahl der Einzelmessungen der TJ-Tiefe der EF-Seite zeigt Tabelle 5:

Tabelle 5: Anzahl der Messungen der TJ-EF-Tiefe

	Zöliakie	Kontrollen
Absorptive Zellschicht	155	145
Kryptenepithel	145	88

Daraus errechneten sich folgende durchschnittliche TJ-Tiefen der EF-Seite:

Tabelle 6: TJ-Tiefe der EF-Seite (nm)

	Zöliakie	Kontrollen
Absorptive Zellschicht	244,1 $\pm$ 75,0	289,1 $\pm$ 57,6
Kryptenepithel	301,8 $\pm$ 91,3	287,8 $\pm$ 81,8

Die durchschnittliche Tiefe der EF-TJ nahm damit bei der Zöliakie von der Krypte zur absorptiven Zellschicht um 57,6 nm (19,1 %) ab, in der Kontrollgruppe blieb sie gleich.

Der Mittelwert der TJ-Tiefe des Oberflächenepithels liegt bei der Zöliakie um 45,0 nm (15,6 %) niedriger als in der Kontrollserie. Die EF-TJ-Tiefe der beiden Kryptenzonen unterscheidet sich mit 14,1 nm (4,9 %) nur geringfügig.

Wie schon bei der PF-TJ-Breite, ist auch in der EF-Seite die Standardabweichung in jeder Zellebene bei Zöliakie größer als in der vergleichbaren Zellebene der Kontrollserie. Die Standardabweichung nimmt bei der Zöliakie vom Krypten- zum Oberflächenepithel um 16,3 nm, bei "Gesunden" um 24,2 nm ab. Sie liegt in der absorptiven Zellschicht bei Zöliakie um 17,4 nm (30 %) über der der Normalen. Die Standardabweichung der Krypten ist mit 9,5 nm (11,6 %) bei Zöliakie ebenfalls größer.

Die Mittelwerte der TJ-EF-Tiefe der Kryptenzone zeigen keinen statistisch signifikanten Unterschied; die Mittelwerte aus der Zone der absorbierenden Zellen unterscheiden sich mit $p \leq 0,001$ signifikant. Die geringe Zunahme der TJ-EF-Breite von der Krypte zur Zotte war bei der Kontrollserie nicht signifikant, die Abnahme der mittleren TJ-Breite bei Zöliakie um 57,6 nm (19,1 %) war mit $p \leq 0,001$ signifikant.

Die Histogramme der Meßwerte aus den beiden Kryptenzonen sind nahezu deckungsgleich (Abb. 16). Die Krypte bei Zöliakie zeigt einen kleinen Anteil sehr breiter TJ-Messungen.

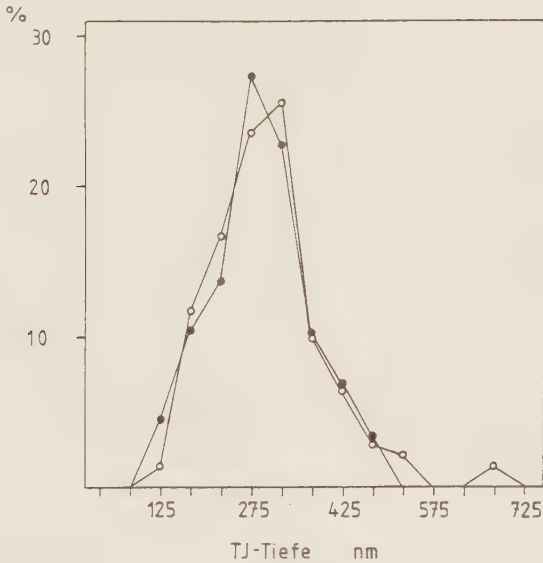


Abb. 16: TJ-Tiefe des Kryptenepithels, EF-Seite.
o = Zöliakie ● = Kontrolle

Die Einzelmeßwerte schwanken in der Zottenebene der Kontrollgruppe in engeren Grenzen als die Werte in der absorptiven Zellschicht Kranker.

Im Histogramm der EF-TJ findet sich bei Zöliakie ein hoher Anteil von TJ-Messungen mit nur geringer Tiefe. Das Histogramm ist deutlich nach links verschoben, der Mittelwert bei Zöliakie geringer. Bei Zöliakie findet sich, wie in der Krypte, ein kleiner Anteil sehr breiter TJ (Abb. 17).

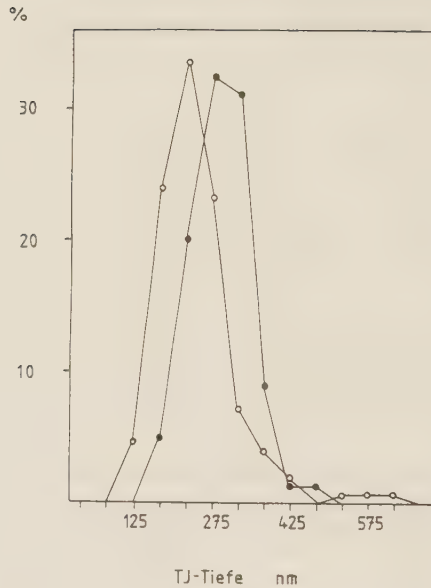


Abb. 17: TJ-Tiefe der absorptiven Zellschicht, EF-Seite.

o = Zöliakie

● = Kontrolle

Der Anteil an TJ-Messungen mit geringer Tiefenausdehnung ist hier besonders deutlich. Zwischen 100 und 150 nm TJ-Breite liegen bei Zöliakie 4,5 % aller Meßwerte, in der Kontrollserie kein Meßwert. In der Klasse von 150 bis 200 nm sind bei der Zöliakie 23,9 %, bei den Kontrollen nur 4,8 % der Meßwerte zu finden.

Eine Übersicht über die mittleren TJ-Tiefen der PF- und der EF-Seiten aller Gewebезonen zeigt Abb. 18.

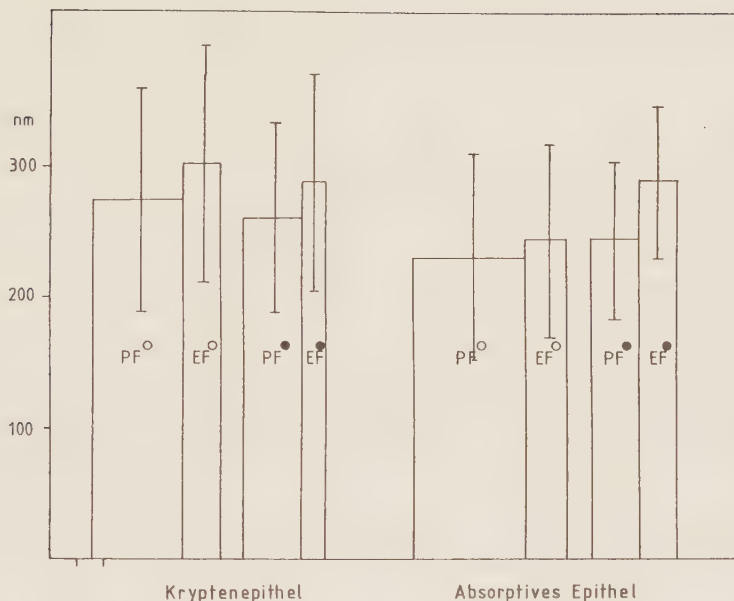


Abb. 18: Mittelwerte der TJ-Tiefe, PF-Seite und EF-Seite.

1 Einheit auf der Abszisse entspricht 100 Messungen der TJ-Tiefe.

○ = Zöliakie

● = Kontrolle

Dabei ist auffällig, daß die EF-Seite in jeder Gewebeschicht eine größere TJ-Tiefe zeigt als die PF-Seite dieser Zone, obwohl aufgrund der Komplementarität der PF- und EF-Seite annähernd identische Meßwerte zu erwarten sind (siehe Diskussion).

4.2.2

ERFASSUNG DER ZAHL DER TJ-ELEMENTE

Gleichzeitig mit der Messung der TJ-Breite wurde die Anzahl der TJ-Elemente (PF-Leisten und EF-Furchen) bestimmt. In konstanten Abständen von $0,4 \mu\text{m}$ wurde die Zahl der von einem Lot getroffenen

TJ-Elemente bestimmt. Geperlte oder lückige TJ-Leisten wurden wie kontinuierliche TJ-Fibrillen behandelt (154).

Nicht mitgezählt wurden TJ-Elemente, die ohne weitere Verknüpfung vom TJ-Band nach basal zogen, oder einzeln unter dem TJ-Band liegende Stränge bzw. Furchen. Es wurden weder auf der PF- noch auf der EF-Seite der TJ Abschnitte gefunden, in denen mit Sicherheit keine TJ-Elemente nachzuweisen waren.

Die Zahl der Messungen weicht aus methodischen Gründen teilweise geringfügig von der Zahl der gemessenen TJ-Breiten ab.

4.2.2.1 TJ-LEISTEN DER PF-SEITE

Der oberste, lumennächste TJ-Strang lag oftmals an einem PF/EF-Membranübergang und war deshalb in diesen Fällen nicht immer leicht zu erkennen (Abb. 22).

Ansonsten ist das PF-Bild der TJ leicht zu identifizieren und eindeutig auszuzählen.

Tabelle 7 zeigt die durchschnittliche Leistenzahl der TJ:

Tabelle 7: Leistenanzahl der PF-TJ

	Zöliakie	Kontrollen
Absorptive Zellschicht	$4,98 \pm 1,16$	$5,53 \pm 1,18$
N =	426	180
Kryptenepithel	$5,76 \pm 1,22$	$5,38 \pm 1,20$
N =	342	213

N = Anzahl ausgewerteter TJ-Schnitte.

Während bei den Kontrollen die durchschnittliche Leistenanzahl

von der Krypte zur absorbierenden Zellzone hin geringfügig - um 0,15 Leisten - ansteigt, sinkt sie bei der Zöliakie um 0,78 Leisten ab.

In der absorptiven Zellschicht liegt die Leistenanzahl bei Zöliakie um 0,55 (10 %) unter der Kontrollserie.

In den Krypten ist die Leistenanzahl bei Zöliakie um 0,38 höher als in denen der Kontrollen.

Die Mittelwerte der PF-Leistenanzahlen in den beiden Gewebeschichten waren jedesmal mit $p \leq 0,001$ statistisch signifikant verschieden. Die Verminderung der Leistenzahl von der Krypte zur Zotte war bei der Zöliakie mit $p \leq 0,001$ statistisch signifikant. Die geringe Zunahme bei den "Normalfällen" war mit $p \leq 0,1$ nicht signifikant.

Die Standardabweichungen liegen jeweils bei den Kryptenwerten etwas höher als bei den Ergebnissen aus dem Oberflächenepithel. Der Variationskoeffizient aus den Meßwerten der absorptiven Schicht liegt bei flacher Mukosa bei 23,3 % gegenüber 19,6 % in der Kontrollgruppe. Abb. 19 zeigt das nach links verschobene Histogramm der TJ-Leistenanzahlen bei Zöliakie in der absorptiven Zellschicht.

PF-TJ der absorptiven Zellschicht, die nur aus 2 Leisten bestehen, finden sich bei Zöliakie in 1,4 % der Messungen, in normalem Gewebe nicht. TJ aus 3 Leisten finden sich in 6,8 %, solche aus 4 Leisten in 26,4 % aller Messungen, gegenüber 2,2 % bzw. 13,9 % bei den Kontrollen. Damit bestehen 34,6 % der TJ der PF-Seite bei Zöliakie aus bis zu 4 Leisten, gegenüber 16,1 % bei den Normalen.

Der Anteil an TJ mit geringer Leistenanzahl ist somit zwischen absorbierenden Oberflächenzellen bei Zöliakie stark vermehrt.

In den Krypten sind die Histogramme der PF-TJ fast identisch (Abb. 20). In beiden Kryptenzonen finden sich TJ mit sehr großer Tiefenausdehnung.

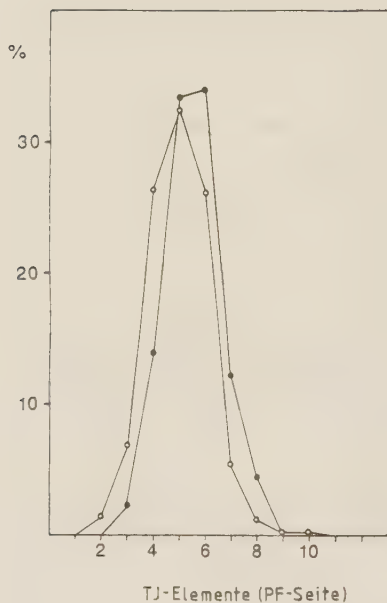


Abb. 19: TJ-Leisten der absorptiven Zellschicht, PF-Seite.

o = Zöliakie ● = Kontrolle

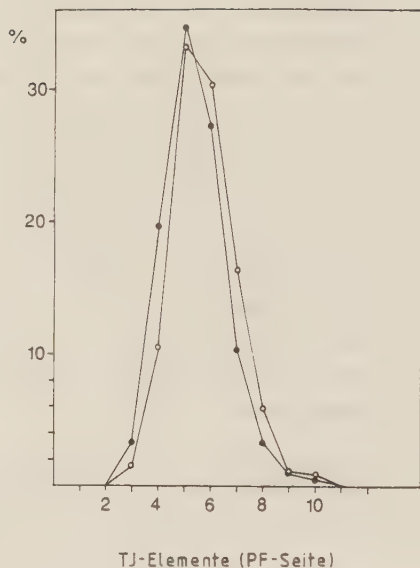


Abb. 20: TJ-Leisten des Kryptenepithels, PF-Seite.

o = Zöliakie ● = Kontrolle

4.2.2.2 TJ-FURCHEN DER EF-SEITE

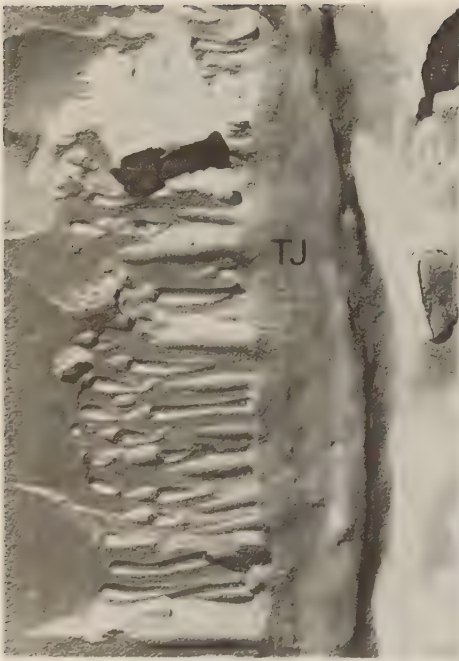
Die Furchen der EF-Seite zeigten insgesamt ein einheitlicheres Bild als die Leisten der PF-Seite.

Einzelne Partikel und zylinderförmige Bruchstücke lagen in den EF-Furchen. Der oberste, lumennächste TJ-Strang lag meist inmitten einer kontinuierlichen EF-Membranhälfte (Abb. 23) und war deshalb leicht abzugrenzen.

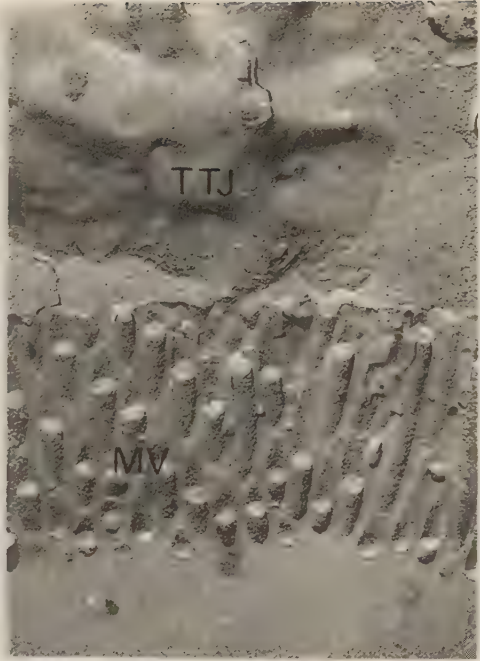


21

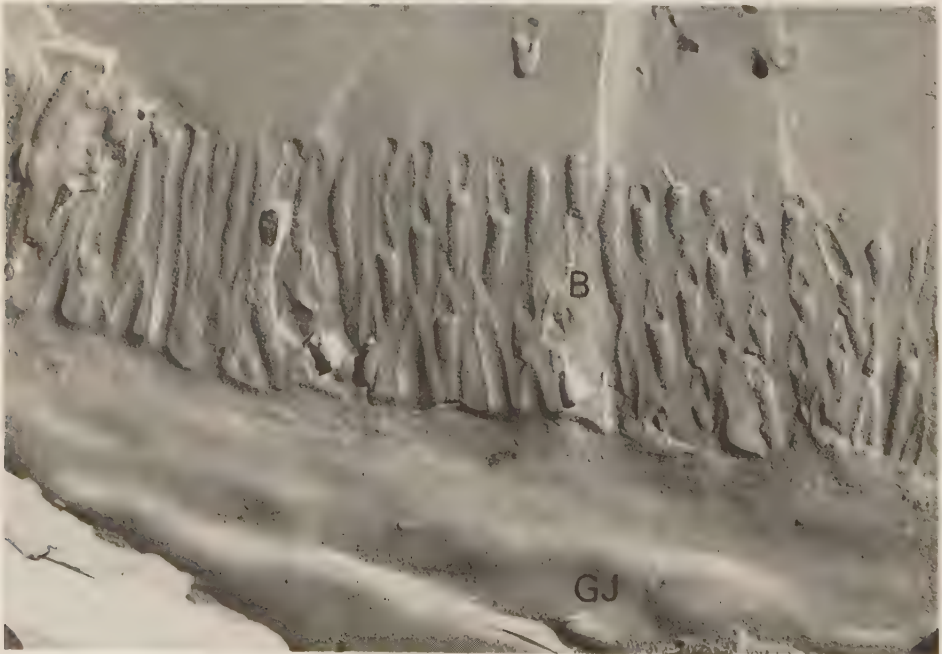
- Abb. 21: Zöliakie, absorptive Zellschicht, komplexes TJ-Band, PF- und EF-Seite, EF-Furchen mit Partikeln besetzt (40500 x).
- Abb. 22: Normale Mukosa, absorptive Zellschicht, apikales TJ-Band, PF-Seite (27000 x).
- Abb. 23: Zöliakie, absorptive Zellschicht, schmale TJ der EF-Seite, lockerer MV-Besatz, (37000 x).
- Abb. 24: Zöliakie, absorptive Zellschicht, Triple-TJ. Dichter IMP-Besatz der Mikrovilli, apikale Zellzone nahezu vesikelfrei (37500 x).



22



24



23

Tabelle 8 zeigt die Mittelwerte für die Zahl der TJ-EF-Furchen:

Tabelle 8: Zahl der TJ-EF-Furchen

	Zöliakie	Kontrollen
Absorptive Zellschicht	$5,14 \pm 0,91$	$6,10 \pm 1,01$
N =	152	143
Kryptenepithel	$6,05 \pm 1,03$	$5,77 \pm 0,94$
N =	135	83

N = Anzahl ausgewerteter TJ-Schnitte

Während die Furchenanzahl - von der Krypte zur absorptiven Zellschicht betrachtet - bei der Zöliakie um durchschnittlich 0,91 Furchen absinkt, steigt diese bei den Kontrollen um 0,33 Furchen an. Der Verlust an EF-Furchen der Zellen bei Zöliakie ist mit $p \leq 0,001$ signifikant, der geringe Anstieg bei den Normalen ist mit $p \leq 0,01$ signifikant.

Die TJ-EF-Furchenanzahl liegt bei den Kontrollen in der Zotte mit 0,96 um durchschnittlich fast eine Furche höher als in der absorptiven Zellschicht bei Zöliakie (-15,7 %). Der Unterschied der durchschnittlichen Anzahl der EF-Furchen in der absorptiven Zellschicht bzw. Zotte war mit $p \leq 0,001$ statistisch signifikant.

In den Krypten ist jedoch die Zahl der Furchen bei Zöliakie um 0,28 höher als in den Krypten der Kontrollgruppe. Die Mittelwerte der EF-Furchenanzahl der Krypten beider Patientengruppen waren mit $p \leq 0,025$ signifikant verschieden.

Die Standardabweichung liegt in allen 4 Datengruppen bei etwa 1, die Variationskoeffizienten betrugen zwischen 16,3 % (Krypten, Kontrollen) und 17,8 % (absorptive Zellschicht, Zöliakie).

Die obigen Zahlen bestätigen damit die Tendenz aus der Messung der Leistenzahl der PF-Seite; jedoch zeigt die EF-Seite zahlenmäßig größere Unterschiede als die PF-Seite.

In Abb. 25 findet sich in der Kryptenzone ein nahezu identisches Aussehen der Histogramme.

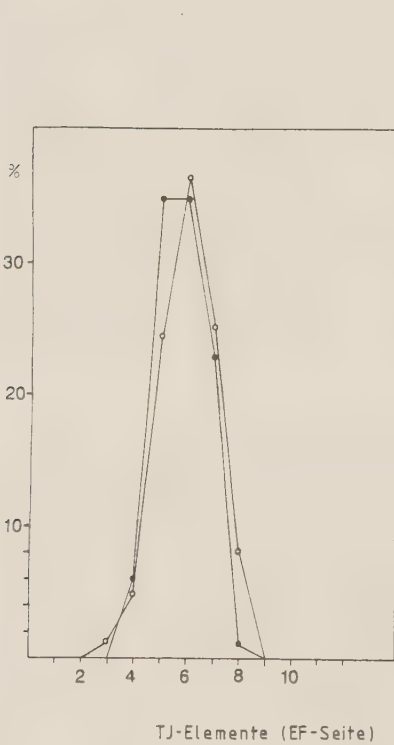


Abb. 25: TJ-Furchen des Kryptenepithels, EF-Seite.

o = Zöliakie

● = Kontrolle

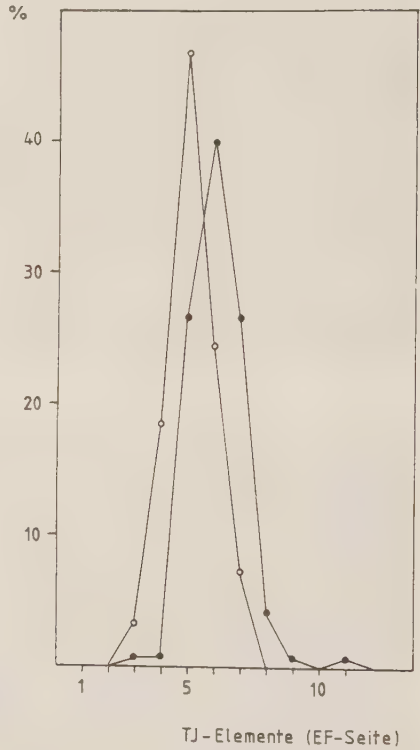


Abb. 26: TJ-Furchen der absorptiven Zellschicht, EF-Seite.

Die deutlichen Unterschiede in der Zone der absorbierenden Zellen

zeigt Abb. 26: 3,3 % der Zählungen bei Zöliakie erbrachten 3 EF-Furchen (Kontrolle: 0,7 %), 18,4 % zeigten 4 Furchen (Kontrolle: 0,7 %). Dies ergibt eine starke Verschiebung des Histogramms bei Zöliakie nach rechts und zeigt deutlich eine ausgeprägte Vermehrung der TJ-Stellen, die mit nur wenigen TJ-Furchen (oder komplementär: TJ-Leisten) besetzt sind.

Nach dieser Zählung - und unter der Annahme einer zufälligen Meßpunktauswahl - besitzen 21,7 % der gesamten TJ-Strecke in der absorptiven Zellschicht der flachen Mukosa bis zu 4 TJ-Furchen, gegenüber nur 1,4 % der TJ-Länge bei der Kontrollgruppe.

Abb. 27 zeigt zusammenfassend die durchschnittliche Anzahl von TJ-Strängen aller Gewebeschichten beider Patientengruppen. Auffällig ist, daß in allen Zellzonen die Durchschnittswerte der EF-Seite höher liegen als die Werte der PF-Seite (siehe Diskussion).

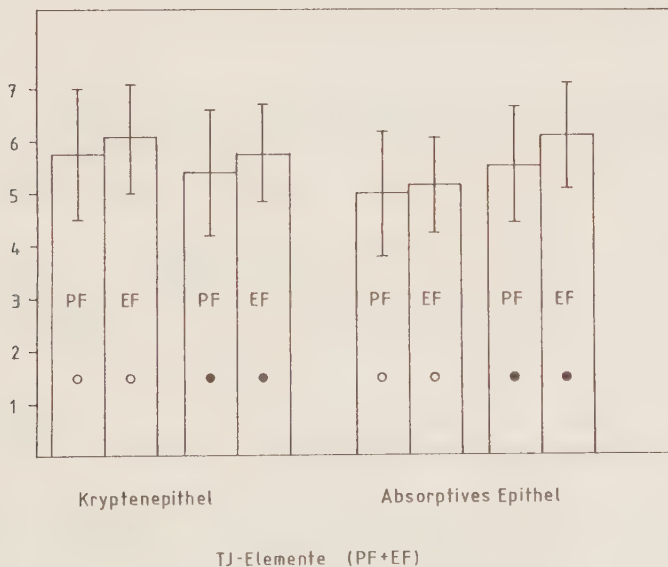


Abb. 27: Mittelwerte der Anzahl an TJ-Elementen, PF-Seite und EF-Seite. o = Zöliakie ● = Kontrolle

4.2.3 DURCHSCHNITTLICHER ABSTAND DER TJ-ELEMENTE

Die zylindrischen Fibrillen, aus denen das TJ-Netz besteht, bilden unregelmäßig geformte Polygone. Es wurde angenommen, daß die Verteilung von Art und Anzahl dieser Polygone zufällig und bei Zöliakie und gesundem Gewebe gleich sei.

Damit ließ sich aus der gemessenen TJ-Tiefe und der Anzahl der TJ-Leisten eine theoretische "Maschenweite" des TJ-Netzes aus dem durchschnittlichen Abstand zwischen zwei senkrecht zur Zelloberfläche "geschnittenen" TJ-Elementen errechnen.

Die Berechnung der Maschenweite erfolgte, nach PF- und EF-Seiten getrennt, für jede Gewebezone beider untersuchter Patientengruppen.

Die Mittelwerte der TJ-Tiefe wurden nach Abzug der Strecke, die von den TJ-Leisten eingenommen wird, durch die um 1 verminderte, durchschnittliche TJ-Leistenzahl dividiert. Als Breite der TJ-Fibrille wurde nach Welsch (185) ein Wert von 8,5 nm verwendet. Für die PF-Seite wurde folgendes Ergebnis errechnet:

Tabelle 9: Maschenweite der PF-Seite (nm)

	Zöliakie	Kontrollen
Absorptive Zellschicht	46,9	43,5
Kryptenepithel	47,3	48,9

Für die EF-Seite wurden folgende Werte erhalten:

Tabelle 10: Maschenweite der EF-Seite (nm)

	Zöliakie	Kontrollen
Absorptive Zellschicht	48,4	46,5
Kryptenepithel	49,6	50,0

Die Werte der EF-Seite liegen alle geringfügig höher als die entsprechenden Werte der PF-Seite (um 2,2-6,9 %).

Die Tendenz innerhalb der beiden Tabellen ist aber für die PF- und EF-Seite identisch: die Maschenweite nimmt jeweils von der Krypte zur Zotte hin ab, bei Zöliakie um 0,8 % (PF) bzw. 2,4 % (EF).

Die Maschenweite bei den Normalen ist in der Krypte größer, in der Zotte kleiner als bei den korrespondierenden Zellschichten der flachen Mukosa. Die Abnahme der Maschenbreite, von der Krypte zur Zotte hin, ist damit deutlicher: um 11 % (PF) bzw. um 7 % (EF).

Die Unterschiede in der Maschenbreite zwischen Zöliakie und der Kontrollserie sind in der absorbierenden Zellzone deutlicher ausgeprägt als in der Kryptenzone. So ist die Maschenbreite der PF-Seite in der absorptiven Zellzone bei Zöliakie um 7,8 %, in der EF-Seite um 4,1 % größer. In der Kryptenzone ist die Maschenbreite bei Zöliakie um 3,3 % (PF) bzw. 0,8 % (EF) geringer als die der Kontrollserie.

Insgesamt liegen die errechneten Maschenweiten in einem recht engen Intervall, das von 43,5 nm bis 50,0 nm reicht. Die Maschenbreite des TJ-Netzes nimmt im Laufe der Zelldifferenzierung in beiden untersuchten Gruppen ab.

4.2.4 BESTIMMUNG DER TRIPLE-TJ-LÄNGE

An der Kontaktstelle dreier Zellen weist die TJ regelmäßig eine besondere Form auf (161). Die TJ beider nebeneinander liegender Zellen wird breiter und ihr unterster Strang zieht bogenförmig nach basal. Am weitesten nach basal ziehen 3 TJ-Leisten, die leiterartig untereinander verbunden sind (Abb. 24).

Da der Abgang dieser leiterartigen Struktur von der Zonula occludens nicht eindeutig feststellbar war, wurde die Triple-TJ von der am weitesten apikal liegenden Leiste bis zu den am weitesten basal liegenden Leisten gemessen.

Triple TJ-Längen der PF- bzw. EF-Seite wurden gemeinsam erfasst.

Die Mittelwerte der Triple-TJ-Längen und die Zahl der jeweiligen Messungen zeigt Tabelle 11.

Tabelle 11: Triple-TJ-Längen (μm):

	Zöliakie	Kontrollen
Absorptive Zellschicht	$1,13 \pm 0,22$	$1,35 \pm 0,34$
N =	56	31
Kryptenepithel	$1,39 \pm 0,32$	$1,37 \pm 0,28$
N =	95	50

N = Anzahl gemessener Triple-TJ's.

Von der Krypte zur absorbierenden Zellschicht nimmt die Triple-TJ bei Zöliakie um $0,26 \mu\text{m}$ oder $18,7 \%$ an Länge ab. Diese Abnahme ist mit $p \leq 0,001$ signifikant.

Die Triple-TJ-Länge ist bei den Kontrollen in Zotte und Krypte

statistisch nicht verschieden.

Die Mittelwerte der Triple-TJ-Längen in den Krypten bei Zöliakie und Kontrollen sind nahezu identisch. Die geringe Längendifferenz der Triple-TJ der Kryptenzone war statistisch ohne Signifikanz.

In der absorptiven Zellzone ist die durchschnittliche Länge bei Zöliakie mit $1,13 \mu\text{m}$ um $0,22 \mu\text{m}$ (17 %) geringer als die der Triple-TJ im Kontrollkollektiv. Die Meßwerte in der absorptiven Zellzone waren mit $p \leq 0,001$ im t-Test signifikant verschieden.

In Abb. 28 ist zu erkennen, daß die Verteilung der Meßwerte aus den beiden Kryptenzonen große Übereinstimmung zeigt.

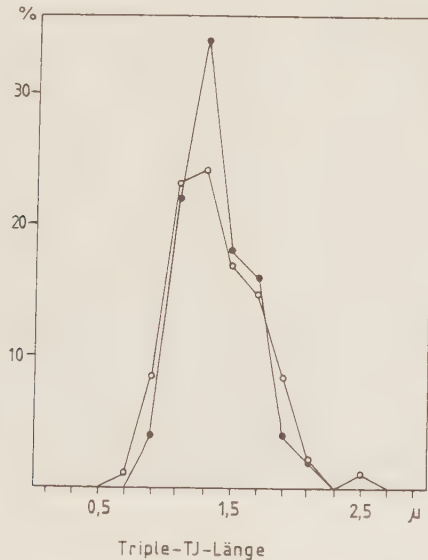


Abb. 28: Triple-TJ-Längen des Kryptenepithels.

o = Zöliakie

● = Kontrolle

Im Oberflächenepithel zeigt das Histogramm bei Zöliakie eine Verschiebung gegenüber dem der Kontrollgruppe (Abb. 29). Dabei

treten Triple-TJ der Klasse von $0,8 \mu\text{m}$ - $1,2 \mu\text{m}$ stark vermehrt auf.

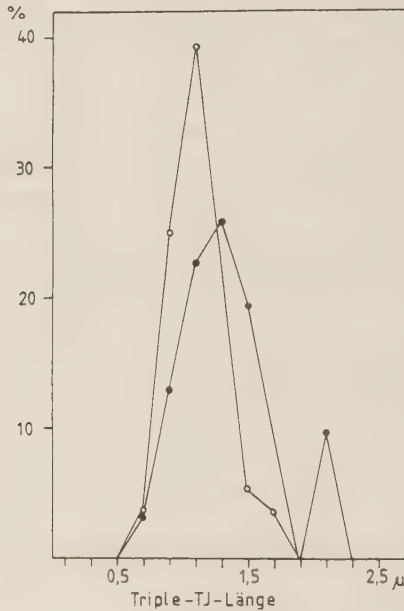


Abb. 29: Triple-TJ-Längen der absorptiven Zellschicht.

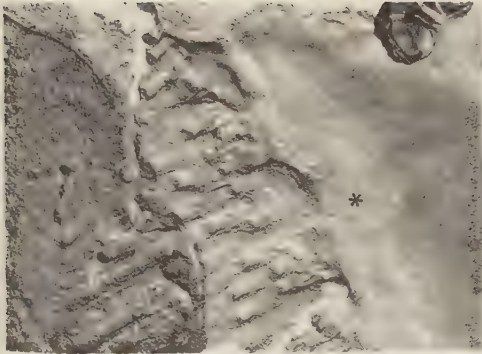
o = Zöliakie

● = Kontrolle

4.2.5 QUANTITATIVE BESTIMMUNG ABERRIERENDER TJ-ELEMENTE

In unterschiedlichem Ausmaß beobachtet man auf der Membran unterhalb der gürtelförmigen, apikalen Zonula occludens TJ-Leisten (PF) bzw. -Furchen (EF), die keine oder keine vollständige Verknüpfung mit der Zonula occludens aufweisen.

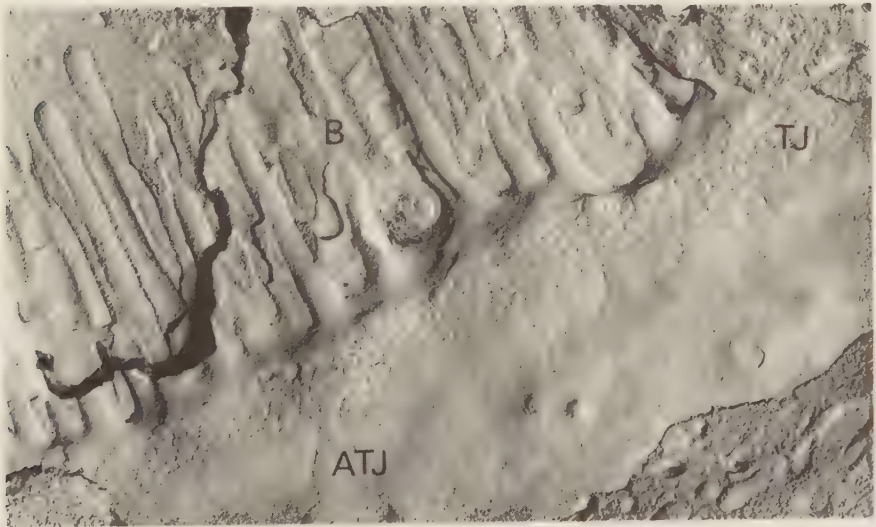
Es handelt sich entweder um kurze TJ-Stränge, die von der untersten Leiste des apikalen TJ-Bandes eine kurze Strecke nach basal ziehen (Abb. 30), oder um weitmaschige, geringgradig verknüpfte TJ-Schleifen (Abb. 31). Wie diese zeigen auch einzelne, parallel



30



31



32

Abb. 30: Zöliakie, absorptive Zellschicht, schmale PF-TJ mit kurzem aberrantem Strang (*), MV-Büschel (27500 x).

Abb. 31: Zöliakie, Kryptenepithel, aberrante TJ-Leisten, Triple-TJ, spärlicher MV-Besatz, abnorme Mikrovilli (*) (34000 x).

Abb. 32: Normale Mukosa, Kryptenepithel, partikelarme apikale Membranzone, aberrierende TJ, unregelmäßiger Bürstensaum (35100 x).

zur untersten TJ-Leiste (bzw.-Furche) liegende TJ-Elemente keine Verbindung mit dem apikalen Netzwerk.

Tice et al. fanden derartige TJ-Figuren bei erhöhter Mitoserate vermehrt im Kryptenepithel der Ratte, vermindert nach Hemmung der Mitose und im (zellteilungsfreien) Zottenepithel. Sie deuten diese TJ-Formen als Ergebnis einer Neuordnung der TJ (167).

Alle aberrierenden TJ-Formen wurden ausnahmslos in einem Membranstreifen von ca. 1 μ m Tiefe unterhalb des apikalen TJ-Bandes beobachtet.

Diese Membranzone war durch ihre Partikelarmut (Abb. 32) und ihren, zur Zelloberfläche streng horizontalen Verlauf von weiter basal folgenden Membranbereichen abzugrenzen.

Im Untersuchungsgut wurden nie TJ-Leisten (-Furchen) unterhalb dieser Membranzone gesehen.

Um das Vorkommen dieser aberrierenden TJ-Elemente zu quantifizieren, wurden sie in ganzer Länge gemessen. Da sie nicht über die gesamte exponierte Membranfläche verteilt vorkamen, sondern nur jeweils in einem mehr oder weniger konstant breiten Membranstreifen, wurde als Bezugsgröße die Gesamtlänge des beobachteten apikalen TJ-Bandes ausgewählt.

Es wurde angenommen, daß die Größe der Membranfläche unter dem TJ-Band und damit das Auftreten aberrierender TJ-Elemente in den Replica zufällig verteilt sei.

PF- und EF-Seiten wurden nicht unterschieden. Insgesamt wurden in allen Replica folgende Gesamtlängen an apikalen PF/EF-TJ-Bändern erfasst:

Tabelle 12: Gesamtlänge erfasster apikaler TJ-Netze (μm)

	Zöliakie	Kontrollen
Absorptive Zellschicht	241,2	121,4
Kryptenepithel	194,8	118,9

In den Membranen der untersuchten Gewebe wurde die Gesamtlänge der aberrierenden TJ-Elemente bestimmt.

Tabelle 13: Gesamtlänge aberrierender TJ-Elemente (μm)

	Zöliakie	Kontrollen
Absorptive Zellschicht	15,3	5,1
Kryptenepithel	153,3	25,0

Bezogen auf die Länge der apikalen TJ-Netze ergab dies:

Tabelle 14: Aberrierende TJ-Elemente (μm)/100 μm TJ (PF/EF)

	Zöliakie	Kontrollen
Absorptive Zellschicht	6,3	4,2
Kryptenepithel	71,7	21,1

Es zeigt sich in beiden Probandengruppen eine starke Abnahme der aberrierenden TJ-Elemente von der Krypte zum Oberflächenepithel. Besonders fällt jedoch das häufige Vorkommen aberrierender Stränge in den Krypten bei flacher Mukosa auf. Dort wurden 10,3 mal mehr aberrierende TJ-Leisten (-Furchen) gefunden als in der absorptiven Zellschicht (Abb. 33).

Die aberrierenden Stränge sind in den "normalen Krypten" gegenüber der Zottenschicht 4-fach häufiger (Abb. 33).

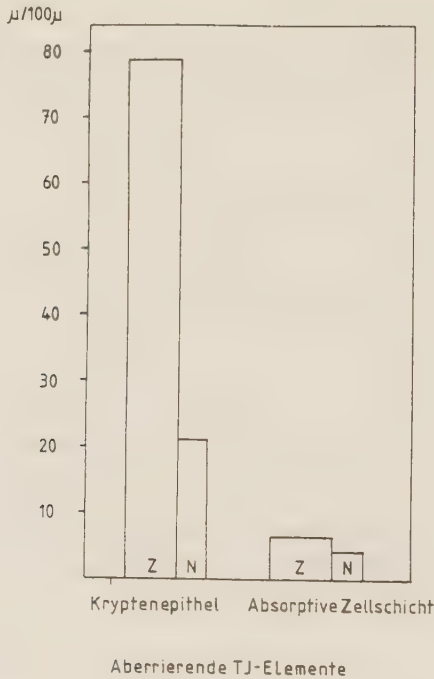


Abb. 33: Aberrierende TJ-Elemente.

1 Einheit auf der Abszisse entspricht 100 μm apikaler TJ-Bänder. Z = Zöliakie N = Normale Kontrollen

Der Unterschied zwischen den beiden Zellzonen mit absorbierendem Epithel ist mit $2,1 \mu\text{m}/100 \mu\text{m}$ TJ gering. Bei der statistischen Prüfung der berechneten Quotienten erwies sich der Unterschied zwischen den Werten beider Gruppen absorbierender Zellen als nicht signifikant.

Beim Vergleich der Werte von Zotten- bzw. absorptiver Zellschicht mit den Werten des zugehörigen Kryptenepithels ergab sich in beiden untersuchten Gruppen eine signifikante Abnahme der Häufigkeit aberrierender TJ-Elemente mit $p \leq 0,001$.

Im Kryptenepithel der flachen Mukosa finden sich die aberrierenden TJ-Elemente 3,4 mal so häufig wie in normalem Kryptenepithel. Mit $p \leq 0,001$ waren die Werte der Kryptenzonen statistisch signifikant verschieden.

4.3INTRAMEMBRANPARTIKEL DER MIKROVILLUSMEMBRAN

Untersucht wurde die Häufigkeit von IMP der Mikrovillusmembran. Die Zählung der Partikel erfolgte getrennt nach PF- und EF-Seiten. In Übereinstimmung mit Literaturangaben (154) wurde trotz der Glutaraldehydfixierung keine Aggregation der IMP beobachtet. Diese erschienen in allen Replica unregelmäßig verteilt und besaßen eine Größe von etwa 5-15 nm (Abb. 34).

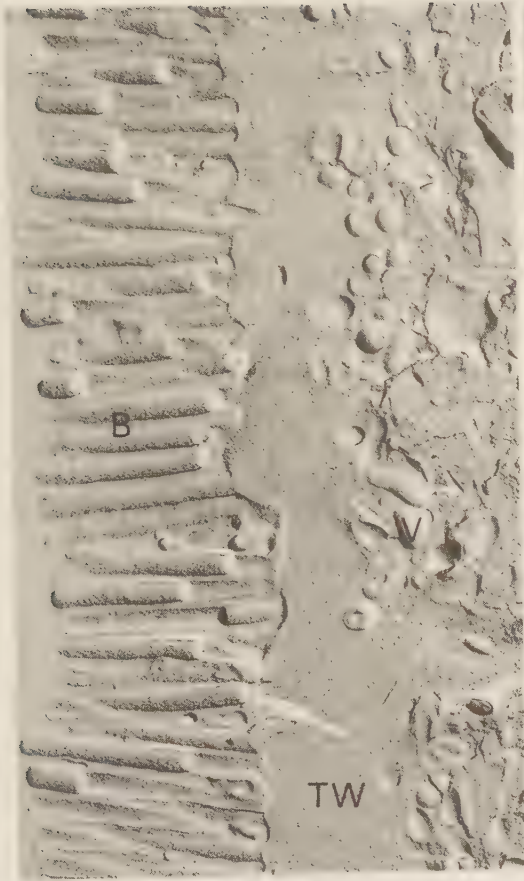
Eine rechteckige Schablone mit bekannter Innenfläche wurde unter das projizierte Bild einer Mikrovillusmembran gelegt. In der Mitte des Mikrovillus wurden alle in der Schablonenfläche liegenden Partikel gezählt und die Zahl der IMP/ μm^2 ermittelt.

Die überwiegende Zahl der ausgewerteten Bilder hatte eine 10000-fache elektronenmikroskopische Vergrößerung.

Mikrovilli von Becherzellen bzw. Mikrovilli einzelner, nicht identifizierbarer Zellen ohne IMP (evtl. Paneth'sche Körnerzellen) wurden ausgesondert (Abb. 35).

4.3.1IMP DER PF-SEITE

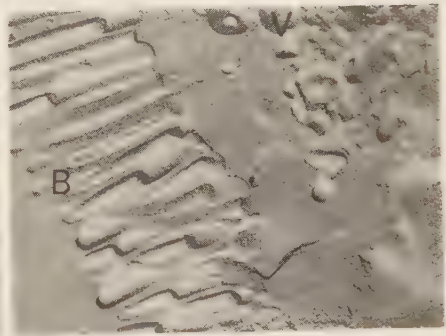
Mikrovillusmembranen der PF-Seite erschienen immer konvex, auf der gewölbten Membran war meist ein dichter Besatz mit IMP zu sehen, der die Membran dicht gekörnt aussehen ließ (Abb. 34). Die Partikel erschienen unregelmäßig über die gesamte PF-Seite der Mikrovillusmembran verteilt.



34



35



36

- Abb. 34: Zöliakie, absorptive Zellschicht, IMP der PF- und EF-Seite, gut abgrenzbare apikale Zellzone (35000 x).
- Abb. 35: Zöliakie, absorptive Zellschicht, Mikrovilli mit spärlichem IMP-Besatz. MV der Nachbarzelle mit normaler IMP-Dichte. Schmales TJ-Band (28500 x).
- Abb. 36: Zöliakie, absorptive Zellschicht, IMP der PF- und EF-Seite, lockerer MV-Besatz, Vesikel in apikaler Zellzone (27000 x).

Tabelle 15: Anzahl erfasster Probeflächen IMP-PF

	Zöliakie	Kontrollen
Absorptive Zellschicht	310	228
Kryptenepithel	271	113

Die Mittelwerte der IMP-Dichte der PF-Seite zeigt Tabelle 16:

Tabelle 16: Intramembranpartikel der PF-Seite (μm^{-2})

	Zöliakie	Kontrollen
Absorptive Zellschicht	2513 $\pm$ 654	3550 $\pm$ 509
Kryptenepithel	1917 $\pm$ 532	2900 $\pm$ 750

Insgesamt liegen die Partikelzahlen bei Zöliakie beträchtlich niedriger als bei den Kontrollen: in den Krypten um 33,9 % und bei den absorptiven Zellen um 29,2 %. Diese Unterschiede sind jeweils mit $p \leq 0,001$ statistisch signifikant.

In beiden Patientengruppen nahm die IMP-Dichte von der Krypte zur absorptiven Zellzone zu, bei der Zöliakie um 596 oder 31,1 %, bei den Kontrollen um 650 oder 22,4 %. Diese Zunahme war in beiden Fällen mit $p \leq 0,001$ signifikant.

Die Standardabweichung nimmt bei Zöliakie zum Oberflächenepithel hin gering zu. Bei den Kontrollen kommt es dagegen zu einer Abnahme der Standardabweichung. Der Variationskoeffizient V_k sinkt

von 25,9 % in der Krypte auf 14,3 % im Zottenepithel. Dies kommt deutlich in Abb. 37 zum Ausdruck: die Werte sind in den Krypten Normaler über einen weiten Bereich verteilt, das Polygon ist flach.

In der Zotte ist die Schwankung der Meßwerte geringer, die Kurve ist nach rechts verschoben.

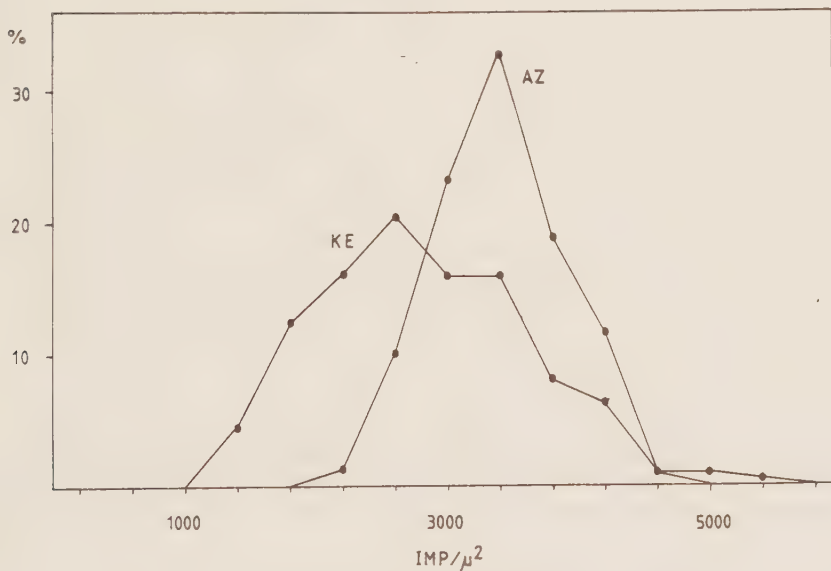


Abb. 37: IMP im Zotten- und Kryptenepithel, Kontrolle, PF-Seite.

Das Histogramm der Werte bei Zöliakie ist in der absorptiven Zellzone breiter als in der Krypte, jedoch ist das Histogramm ebenfalls nach rechts verschoben (Abb. 38).

In beiden Epithelzonen ist die Werteverteilung bei Zöliakie gegenüber den Kontrollen stark nach links verschoben (Abb. 39 und 40).

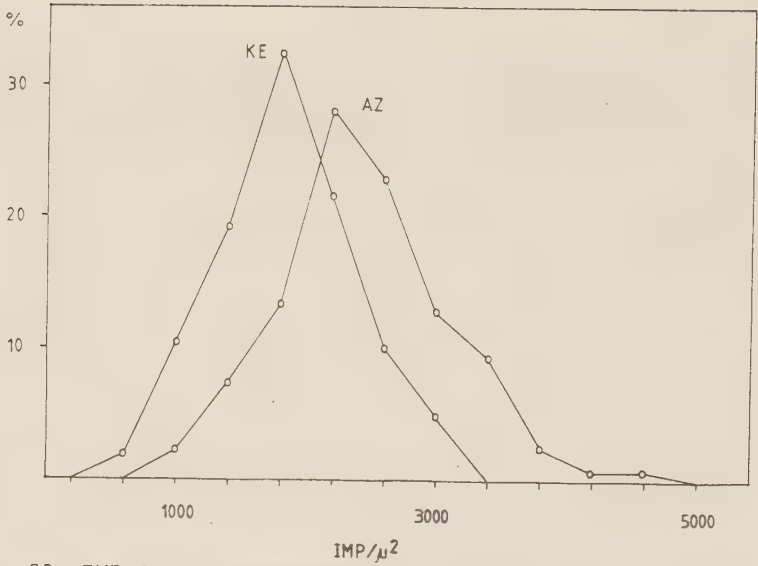


Abb. 38: IMP in Kryptenepithel und absorptiver Zellschicht, Zöliakie, PF-Seite.

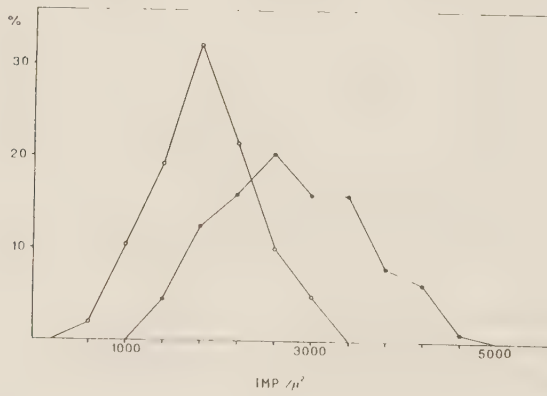


Abb. 39: IMP des Kryptenepithels, PF-Seite.

○ = Zöliakie

● = Kontrolle

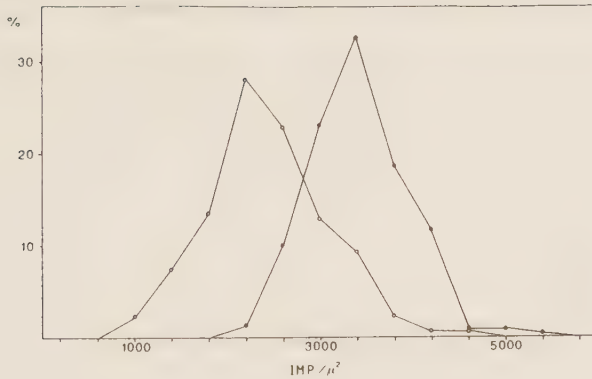


Abb. 40: IMP der absorptiven Zellschicht, PF-Seite.

o = Zöliakie

● = Kontrolle

Die Dichte des IMP-Besatzes der Mikrovilli der Oberflächenzellen ist damit bei Zöliakie deutlich inhomogener als bei Normalen. Die starke Schwankung der Partikeldichte der Kryptenzellen vermindert sich - im Gegensatz zu den Normalen - im Laufe der Zelldifferenzierung nicht.

In der absorptiven Zellzone bei Zöliakie werden neben sehr niedrigen auch sehr hohe Partikelzahlen gefunden. Die hohen Werte (> 4000 Partikel/ μm^2) erreichen fast die höchsten Partikeldichten aus normalen Zottengewebe.

4.3.2

IMP DER EF-SEITE

Die EF-Seite der Mikrovillusbmembran erschien immer konkav. Die Partikeldichte der EF-Seite ist immer wesentlich geringer als die der PF-Seite. Die Partikel der EF-Seite waren, wie die der PF-

Seite, unregelmäßig verteilt (Abb. 36); ein Teil der IMP erschien größer als die Partikel der PF-Seite.

Tabelle 17: Anzahl erfasster Probeflächen IMP-EF

	Zöliakie	Kontrollen
Absorptive Zellschicht	301	187
Kryptenepithel	237	118

Nach Berechnung der Partikelzahl pro μm^2 wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet:

Tabelle 18: Intramembranpartikel der EF-Seite (μm^{-2})

	Zöliakie	Kontrollen
Absorptive Zellschicht	853 ± 331	1357 ± 416
Kryptenepithel	804 ± 335	1110 ± 432

In beiden Gruppen erhöht sich die Zahl der IMP von den Krypten zur absorptiven Zellzone, bei Zöliakie um $49/\mu\text{m}^2$ oder 6,1 %, in der Kontrollgruppe um $247/\mu\text{m}^2$ oder 22,3 %. Dieser Anstieg der IMP-Zahl war bei Zöliakie mit $p \leq 0,05$, bei Normalen mit $p \leq 0,001$ statistisch signifikant.

Die IMP der EF-Seite finden sich bei den Kontrollen ebenfalls wieder in beiden Gewebезonen deutlich vermehrt.

In der Kryptenzone ist die Differenz zu den Krypten bei Zöliakie

306 Partikel/ μm^2 oder 27,6 %, im absorbierenden Epithel 504 Partikel/ μm^2 oder ein Defizit von 37,1 % bei Zöliakie. Diese Unterschiede sind mit $p \leq 0,001$ signifikant.

Die Standardabweichungen sind bei beiden Patientengruppen in Oberflächen- und Kryptenepithel etwa gleich groß.

Insgesamt ist der Variationskoeffizient wegen der geringen Partikelzahlen recht hoch: er beträgt bei Zöliakie in der Krypte 41,7 % und sinkt in der absorbierenden Zellzone auf 38,8 % geringfügig ab.

Bei den Kontrollen liegen die Variationskoeffizienten nur wenig niedriger: in der Krypte bei 38,9 %, in der Zotte bei 30,7 %. Die IMP-Dichte der MV-Membranen der Kryptenepithelzellen weist besonders große Schwankungen auf – ein Hinweis auf einen Zusammenhang mit den verschiedenen Entwicklungsstadien der Zellen.

Das Histogramm der absorptiven Zellschicht bei Zöliakie ist gegenüber dem der Kontrollen nach links verschoben (Abb. 41).

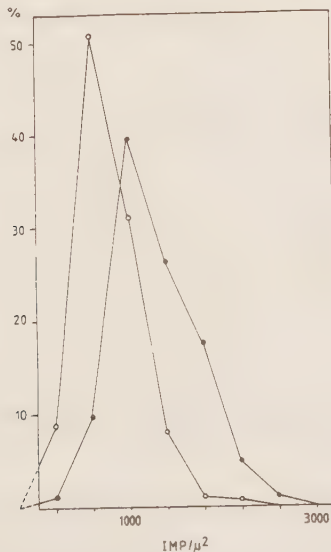


Abb. 41: IMP der absorptiven Zellschicht, EF-Seite.

o = Zöliakie

● = Kontrolle

Die Histogramme der Kryptenepithelschichten sind von ähnlicher Form; das Histogramm bei Zöliakie ist wiederum zu niedrigeren Werten hin verschoben (Abb. 42).

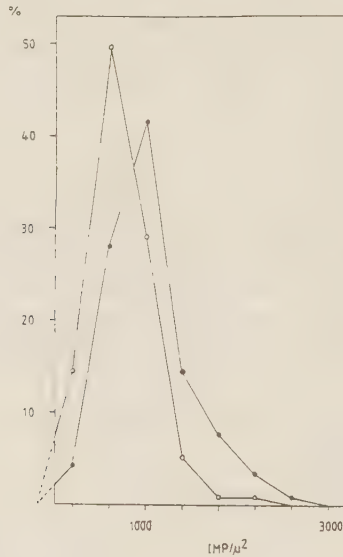


Abb. 42: IMP des Kryptenepithels, EF-Seite.

o = Zöliakie

● = Kontrolle

4.3.3

VERGLEICH DER IMP-DICHTE ZWISCHEN PF- UND EF-SEITE

Aus den obigen Daten ergibt sich in der flachen Mukosa ein Defizit von 27,6 % - 37,1 % an IMP, je nach Gewebezone und Membrbruchhälfte.

Tabelle 19: IMP-Defizit/ μm^2 der MV-Membranen bei Zöliakie

	PF-Seite		EF-Seite	
	absolut	relativ	absolut	relativ
Absorptive Zellschicht	1037	29,2 %	504	37,1 %
Kryptenepithel	993	33,9 %	306	27,6 %

Beim Vergleich der IMP-Dichte der PF- und EF-Seite einer Gewebzone ergibt sich, daß die EF-Partikel in einem recht konstanten Verhältnis zu den PF-IMP auftreten.

Dies gilt sowohl für die flache Mukosa bei Zöliakie, als auch für das Gewebe der gesunden Probanden.

Tabelle 20: Verhältnis der EF-IMP zur Zahl der PF-IMP(in %)

	Zöliakie	Kontrollen
Absorptive Zellschicht	33,9 %	38,2 %
Kryptenepithel	41,9 %	38,3 %

Das Verhältnis der Partikel der PF- und der EF-Seite bleibt bei den "Normalen" in beiden Gewebzonen gleich, während es in der flachen Mukosa in der absorptiven Zellschicht zu einer relativen Vermehrung der PF-IMP gegenüber den EF-IMP kommt.

Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung des Dünndarm-epithels ist der Bürstensaum ein besonders charakteristisches Strukturmerkmal der Epithelzelle (13, 177).

Es wurde berechnet, daß die Mikrovilli die Oberfläche des normalen Dünndarms um den Faktor 30 (118) auf ca. 300 m² vergrößern (105).

In der Dünnschnittelektronenmikroskopie gelten die Strukturveränderungen des Mikrovillus bei Zöliakie als ein häufig beobachtetes Leitsymptom für die schweren Veränderungen an der Dünndarm-epithelzelle. Es wird von verdickten, verkürzten, und vermehrt mißgebildeten Mikrovilli berichtet (23, 145), ebenso von einer verminderten Mikrovillusdichte der absorbierenden Zelle.

Übereinstimmend berichten viele Autoren, daß der Bürstensaum des Kryptenepithels, verglichen mit Kripten aus normaler Mukosa, keine Veränderungen zeigt (133, 143).

Wenn auch teilweise Zahlenwerte für die morphologischen Veränderungen der Mikrovilli angegeben werden (23, 65, 133, 143), so liegt doch keine systematische Untersuchung über die Veränderung der Mikrovilli vor.

Keinerlei Angaben existieren über das Ausmaß und die quantitative Auswirkung der Formveränderung des MV und des geringeren Mikrovillusbesatzes im absorptiven Epithel auf die resorptionsfähige Dünndarmoberfläche.

Da die Mikrovilli durch die Gefrierbruchtechnik in großer Zahl dargestellt werden, konnte die Form und Häufigkeit der Mikrovilli quantitativ erfasst werden. Besonderer Wert wurde dabei auf einen möglichst repräsentativen Querschnitt durch die Bürstensäume aller untersuchten Gewebezonen gelegt.

Da durch den Gefrierbruch das Gewebe in zufälliger Höhe und Richtung gebrochen wird, kann angenommen werden, daß Mikrovillussäume aus unterschiedlichen Zellentwicklungsstadien der Zotten

bzw. Krypten und von unterschiedlichen Stellen der Oberfläche flacher Mukosa erhalten werden konnten.

4.4.1 MESSUNG DER MIKROVILLUSLÄNGE

Die Bürstensäume werden durch den Gefrierbruch in weitaus höherem Maße dargestellt als die TJ, da jeder Bruch durch eine Epithelzelle zum Lumen hin den Bürstensaum durchschneidet.

Es zeigte sich, daß die Bürstensäume des Oberflächenepithels bei Zöliakie nicht nur die aus der Dünnschnittelektronenmikroskopie bekannten "typischen", stark veränderten Mikrovilli zeigten. Häufig waren auch gut ausgebildete Mikrovillussäume zu sehen.

An den Zottenepithelzellen der Kontrollgruppe wurden zwar ganz überwiegend gutorganisierte Bürstensäume mit hohen, schlanken und dichtstehenden Mikrovilli dargestellt, doch gab es auch hier in geringem Ausmaß "untypische" Bürstensäume.

Um daher nicht nur jeweils die "typische" Zellmorphologie zu erfassen und einen repräsentativen Querschnitt durch alle Bürstensäume zu erhalten, wurde versucht, die Auswahl der photographierten Ausschnitte aus den Bürstensäumen möglichst zufällig zu treffen. Es wurden - je nach Länge des Mikrovillussaumes - der ganze Bürstensaum oder in unterschiedlichen Abständen verteilt, einzelne Ausschnitte photographiert.

Nur Mikrovilli, die in ganzer Länge zu erkennen waren, wurden gemessen. In Bürstensäumen in denen viele Mikrovilli in ganzer Länge dargestellt waren, wurden die zu messenden Mikrovilli zufällig ausgewählt.

Die Mittelwerte der Mikrovilluslänge zeigt Tabelle 21:

Tabelle 21: Durchschnittliche Mikrovilluslänge (μm)

	Zöliakie	Kontrollen
Absorptive Zellschicht	$1,00 \pm 0,29$	$1,24 \pm 0,28$
N =	1272	1007
Kryptenepithel	$1,04 \pm 0,33$	$1,15 \pm 0,40$
N =	795	489

N = Anzahl gemessener Mikrovilluslängen.

Die durchschnittliche MV-Länge nimmt bei den Kontrollen im Laufe der Zelldifferenzierung von der Krypte zur Zotte hin um $0,09 \mu\text{m}$ (7,8 %) zu ($p \leq 0,001$). Die Standardabweichung nimmt von $0,40 \mu\text{m}$ auf $0,28 \mu\text{m}$ ab. Dies ergibt eine Abnahme des Variationskoeffizienten von 34,8 % auf 22,6 %: die Länge der MV der Zottenepithelzellen wird einheitlicher.

Histogramm 43 zeigt die schmale Verteilung der Meßwerte aus der Zotte. Besonders die MV der Länge von 1,0 bis $1,6 \mu\text{m}$ werden im Zottenepithel gefunden (zusammen 72,6 % der Meßwerte).

In den Krypten - aus denen Zellen aller Entwicklungsstufen dargestellt wurden - finden sich sowohl kurze als auch lange Mikrovilli (Abb. 43). Die MV der Klasse von 1,2 bis $1,4 \mu\text{m}$ sind im Kryptenepithel auffällig häufig und könnten größtenteils aus reifen Zellen der mittleren und oberen Kryptenzone stammen.

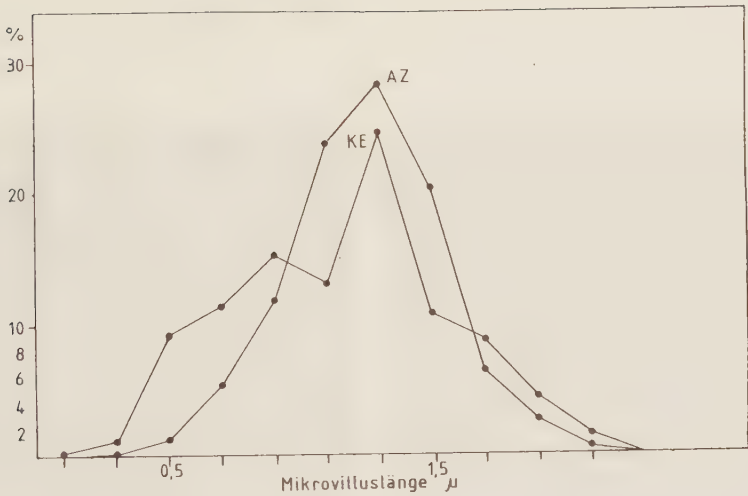
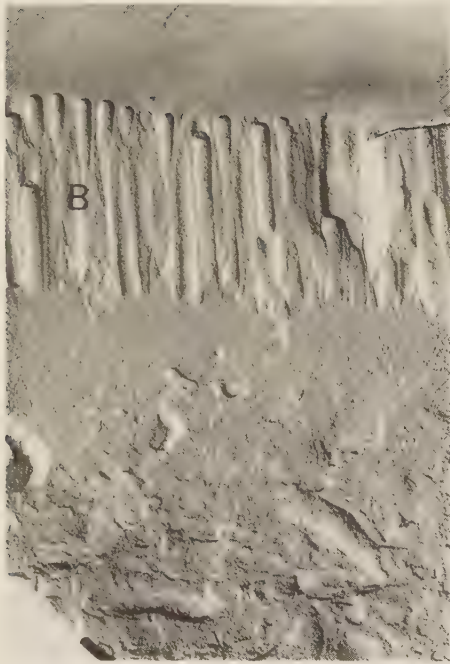


Abb. 43: Mikrovillusbänge in absorptiver Zellschicht und Kryptenepithel, Kontrolle.

Abb. 44 zeigt den typischen Befund an der absorbierenden Zottenzelle: den regelmäßigen, hohen Bürstensaum mit parallel stehenden, schlanken Mikrovilli.

Bei Zöliakie nimmt die Mikrovillusbänge, von der Krypte zur Zotte hin, um 3,8 % ab ($p \leq 0,005$). Gleichzeitig sinkt die Standardabweichung. Daher nimmt der Variationskoeffizient von 31,7 % auf 29 % nur geringfügig ab.

In Abb. 46 zeigt sich daher eine fast identische Verteilung der Meßwerte aus Krypten- und Oberflächenepithelzellen. Die absorptive Zellschicht weist einen hohen Anteil kurzer Mikrovilli, aber auch gut entwickelte, lange Mikrovilli auf.



44



45

Abb. 44: Normale Mukosa, absorptive Zellschicht, dichter Bürstensaum mit langen, schlanken Mikrovilli, homogene apikale Zellzone (27000 x).

Abb. 45: Normale Mukosa, absorptive Zellschicht, degradierte Bürstensaum (30000 x).

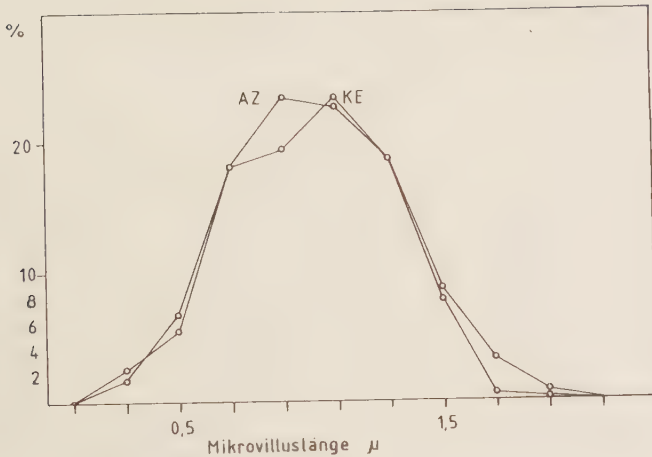


Abb. 46: Mikrovillustänge in absorptiver Zellschicht und Kryptenepithel, Zöliakie.

Im Durchschnitt sind bei der Zöliakie die MV des Oberflächenepithels um 19,4 % kürzer als die normaler Zotten, die MV der Krypten um 9,6 % kürzer als die normaler Krypten. Beim Vergleich der Mittelwerte ergaben sich sowohl im absorbierenden Epithel als auch im Kryptenepithel jeweils statistisch signifikante Unterschiede mit $p \leq 0,001$.

In Abb. 47 zeigen die Werte aus den beiden Kryptenebenen eine ähnliche Verteilung: die Meßwerte beider Patientengruppen sind über einen weiten Bereich gestreut, es werden sowohl sehr kurze als auch sehr lange MV gefunden. Die Variationskoeffizienten sind mit 38,4 % (Normal) und 31,7 % (Zöliakie) nur wenig verschieden.

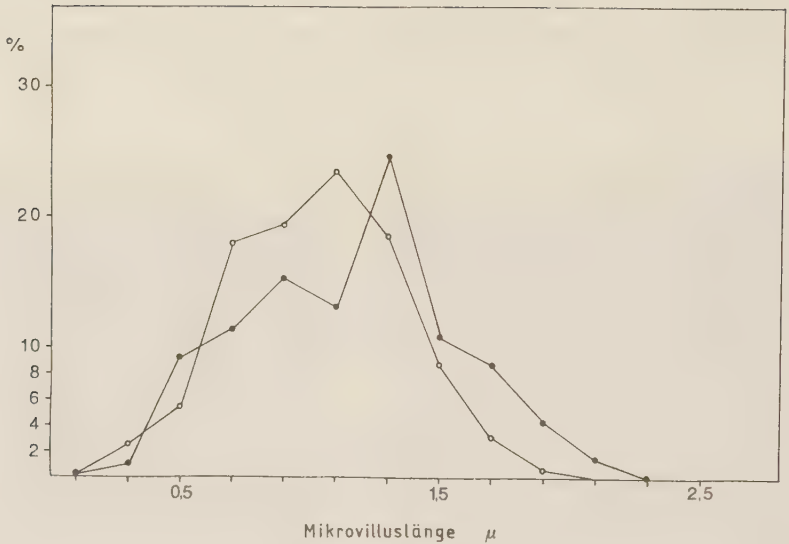


Abb. 47: Mikrovilluslänge des Kryptenepithels.

o = Zöliakie

● = Kontrolle

Beim Vergleich der Meßwerte aus der absorptiven Schicht (Abb. 48) ist das Polygon bei Zöliakie deutlich nach links, zu kleineren MV-Längen hin, verschoben. Zudem streuen die MV-Längen bei Zöliakie in einem weiteren Bereich als die aus der gesunden Mukosa.

Sehr kurze MV aus den Zotten "Gesunder" stammen zum großen Teil aus Zellen, die starke Degradationserscheinungen zeigen (Abb. 45). Hierbei erscheint oft das TW stark verschmälert. Diese Mikrovilli dürften aus der Extrusionszone und damit aus Zellen stammen, die gerade zugrunde gehen.

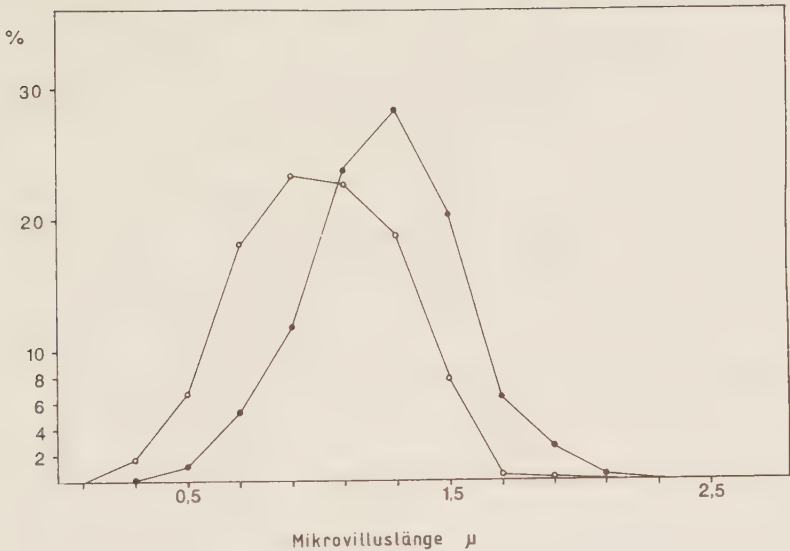


Abb. 48: Mikrovillustänge der absorptiven Zellschicht.

o = Zöliakie

● = Kontrolle

4.4.2 MIKROVILLUSDURCHMESSER

Aus Dünnschnittuntersuchungen ist bekannt, daß die Mikrovilli der Dünndarmepithelzellen keine konstante Dicke aufweisen. Die MV sollen mit der Wanderung der Zellen von der Stammzellzone zum Zottenepithel sowohl länger als auch schlanker werden (23, 143). Im Oberflächenepithel bei Zöliakie werden die MV als verkürzt, verplumt und verdickt beschrieben (65).

Die Dicke der MV ließ sich an den häufig vorkommenden abgebrochenen MV bestimmen. Da die Bürstensäume häufig schräg angebrochen werden, war es möglich, eine große Zahl an Mikrovilli zu

messen. Die Bruchstelle erscheint oval, der Querdurchmesser wurde parallel zur Zelloberfläche von PF-Seite zu PF-Seite erfasst. Gemessen wurde der Durchmesser der Bruchstelle in der Mitte des Mikrovillus. Es wurde versucht, möglichst zufällig verteilte Bruchflächen auszumessen.

Die Dicke gebüschelter MV wurde im verzweigten Teil erfasst. Nach der statistischen Auswertung ergaben sich folgende Mittelwerte und Standardabweichungen:

Tabelle 22: Mikrovillusdurchmesser (μm)

	Zöliakie	Kontrollen
Absorptive Zellschicht	$0,107 \pm 0,025$	$0,103 \pm 0,023$
N =	1245	881
Kryptenepithel	$0,117 \pm 0,033$	$0,106 \pm 0,027$
N =	984	519

N = Anzahl gemessener Mikrovillusdurchmesser.

Damit bestätigen sich die Beobachtungen der Dünnschnittelektromikroskopie: die durchschnittliche Dicke der Mikrovilli nimmt in beiden Gruppen mit steigender Differenzierung der Zellen ab. Die Abnahme des MV-Durchmessers liegt bei Zöliakie bei 10 nm (8,5 %), bei den Normalen bei 3 nm (2,8 %). Gleichzeitig streuen die Meßwerte bei beiden Patientengruppen im Oberflächenepithel weniger stark. Die Abnahme der MV-Dicke war bei den Gesunden mit $p \leq 0,025$, die Abnahme bei Zöliakie mit $p \leq 0,001$ signifikant.

Der Durchschnittswert der MV-Dicke ist in jeder Schicht der flachen Mukosa größer als in der entsprechenden Zellebene der Normalen. Verglichen mit den MV der normalen Krypten sind die MV

aus der Kryptenzone von Zöliakiepatienten im Durchschnitt um 11 nm (10,3 %) dicker, die Standardabweichung liegt höher. Der Variationskoeffizient liegt mit 28,2 % geringfügig höher als in der Kontrollgruppe (25,4 %) (Abb. 49). Damit ist die Kurve bei Zöliakie deutlich nach rechts verschoben.

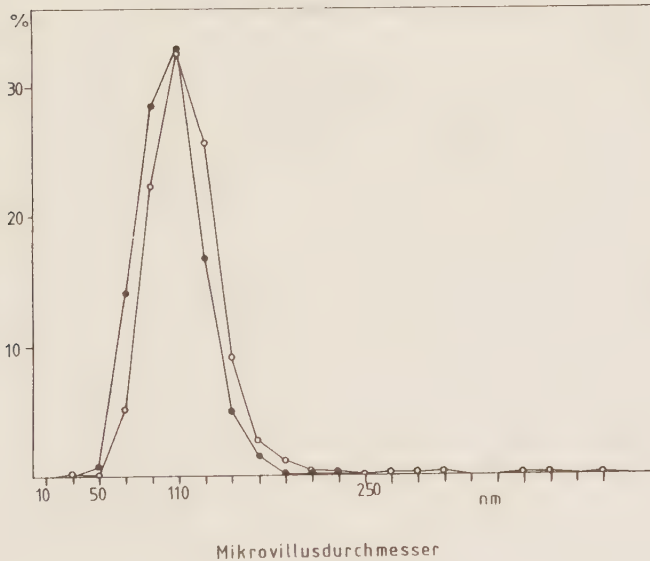


Abb. 49: Mikrovillusdurchmesser des Kriptenepithels.

o = Zöliakie ● = Kontrolle

Auch im Oberflächenepithel ist der Mikrovillus bei Zöliakie plumper: mit 107 nm ist er durchschnittlich um 4 nm (3,9 %) dicker als der Mikrovillus reifer Epithelzellen. Die niedrigste Standardabweichung findet sich mit 23 nm in der Zottenebene der Gesunden. Dort sind die MV besonders schlank und der Durchmesser schwankt in engen Grenzen.

Die Variationskoeffizienten sind jeweils niedriger als in den

Krypten und liegen bei 22,3 % (Kontrollen) und 23,4 % (Zöliakie). Abb. 50 zeigt deshalb auch eine fast identische Verteilung der Meßwerte aus beiden absorbierenden Zellschichten, mit nur geringer Verschiebung der Kurve zu höheren MV-Dicken bei Zöliakie.

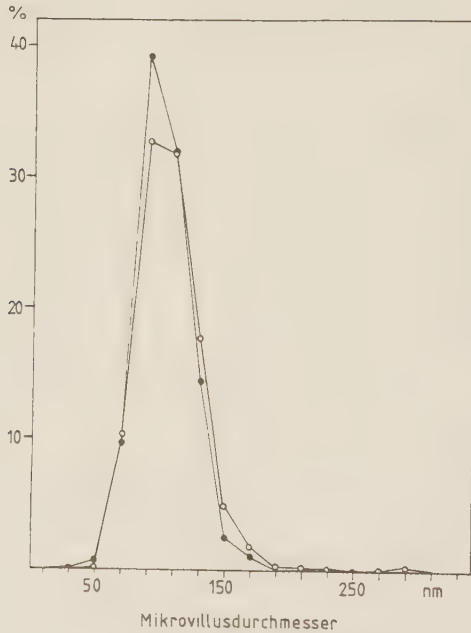


Abb. 50: Mikrovillusdurchmesser der absorptiven Zellschicht.

o = Zöliakie

● = Kontrolle

Die Unterschiede in den Durchmessern der Kryptenmikrovilli waren mit $p \leq 0,001$, die der Mikrovilli aus dem Oberflächenepithel mit $p \leq 0,01$ statistisch signifikant.

In beiden Histogrammen fällt die Zahl der Meßwerte innerhalb der Klasse von 60-80 nm abrupt ab und unterhalb von 60 nm werden nur noch äußerst vereinzelt Mikrovilli gefunden. Ebenso sind MV mit einem Durchmesser > 180 nm nur selten zu finden.

4.4.3 VERGLEICH VON MIKROVILLUSLÄNGE UND -DURCHMESSER

Während Mikrovilli in allen Stadien der Längenentwicklung gefunden werden, überschreitet der MV-Durchmesser immer eine gewisse Mindestgröße (s.o.). Die kritische Grenze für die Ausbildung eines Mikrovillus scheint bei einem Durchmesser von ca. 80 nm zu liegen.

Mit zunehmender Zellreifung werden die Mikrovilli der Kontrollgruppe länger und schlanker. Das Verhältnis von MV-Länge zu MV-Dicke nimmt von 10,8 in der Krypte auf 12,0 in der Zotte zu.

Die durchschnittliche Länge der MV bei Zöliakie vermindert sich zwar, von der Krypte zur Zotte hin gesehen, etwas; jedoch nimmt der MV-Durchmesser mit steigender Zelldifferenzierung vergleichsweise stärker ab. Dadurch steigt das Verhältnis MV-Länge/MV-Dicke geringfügig von 8,9 auf 9,3 an.

Tabelle 23: MV-Länge/MV-Durchmesser

	Zöliakie	Kontrollen
Absorptive Zellschicht	9,3	12,0
Kryptenepithel	8,9	10,8

Die Längenentwicklung des MV erscheint bei Zöliakie weitaus mehr beeinträchtigt als die Ausbildung des normalen MV-Durchmessers. Damit ist der MV bei Zöliakie in der absorptiven Zellzone in seiner Entwicklung weit hinter dem MV der normalen Zotte zurück.

4.4.4 DICHTER DES MIKROVILLUSBESATZES DER ZELLOBERFLÄCHE

Der Umfang der Oberflächenvergrößerung des Dünndarms hängt von den Proportionen der Mikrovilli und besonders von der Zahl der MV auf der luminalen Oberfläche der Epithelzelle ab.

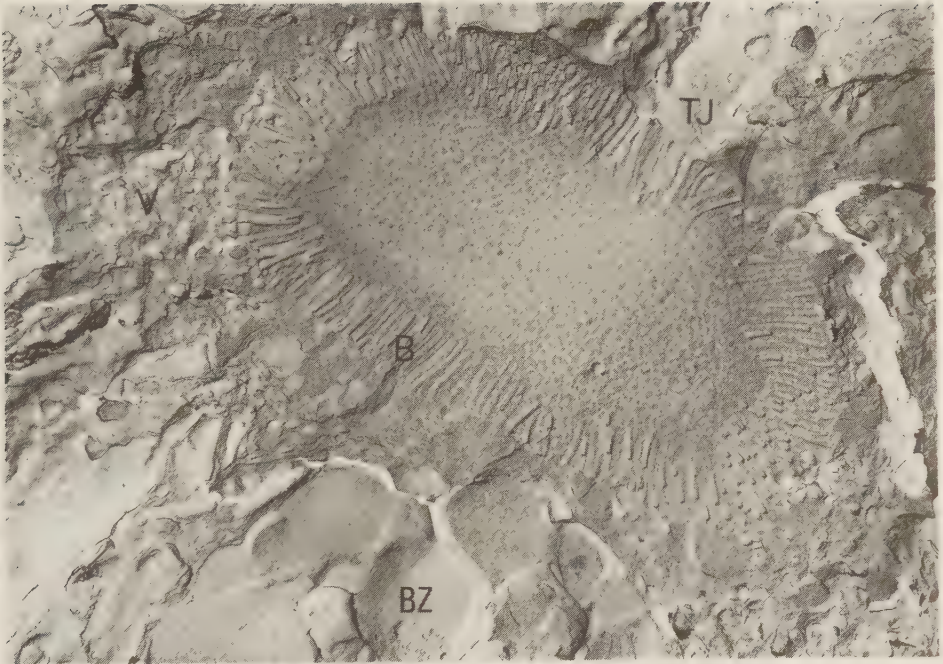
Eine statistisch gesicherte Erfassung der MV-Dichte gibt es bislang weder für normale Dünndarmmukosa noch für Dünndarmmukosa bei Zöliakie.

Die Mikrovillusdichte wird durch die Zahl der MV je $1 \mu\text{m}^2$ apikaler Zellmembranfläche ausgedrückt.

Aus den Krypten wurden Replica mit sehr spärlichem, aber auch Replica mit sehr dichtem, hochentwickeltem Mikrovillusbefall erhalten (Abb. 51 und 52).

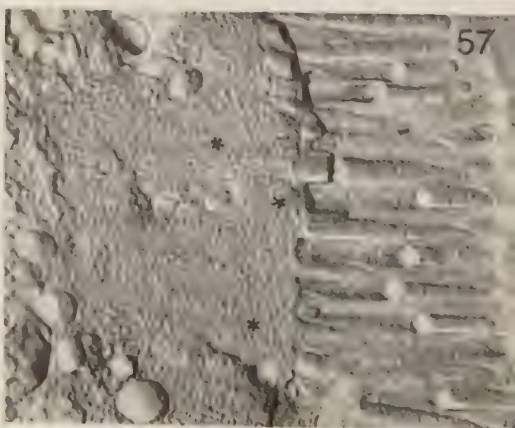
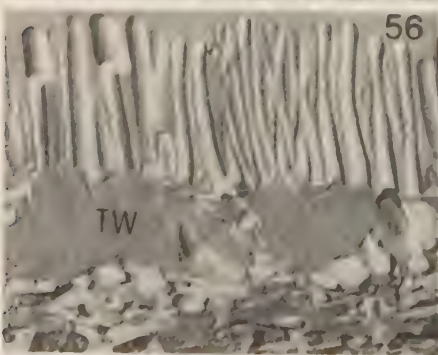
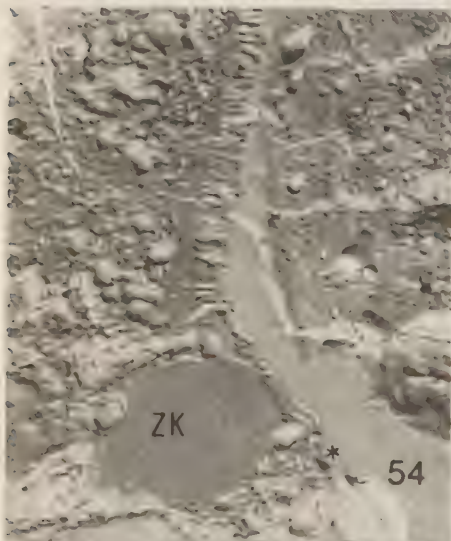
Die normalen Zotten zeigten erwartungsgemäß überwiegend regelmäßige Bürstensäume (Abb. 44) mit schlanken, dichtstehenden MV einheitlicher Form und Größe. Einige Replica mit stark unregelmäßigem, degradiert erscheinendem Bürstensaum stammten von absterbenden Zellen der Extrusionszone. Vereinzelt wurden defekte Zellen bei der Ausstoßung in das Lumen beobachtet (Abb. 53).

Im absorbierenden Epithel der flachen Mukosabiopsien waren die Bürstensäume sehr inhomogen: neben Zellen mit nur geringen MV-Resten bis hin zu oberflächlicher Ulzeration (Abb. 54), wurden Zellen mit stark verplumpten und vereinzelter MV (Abb. 55), aber auch Epithelzellen mit annähernd regulärem Bürstensaum gesehen (Abb. 56).



51

- Abb. 51: Zöliakie, Kryptenepithel, dichter Bürstensaum, häufige apikale Vesikel; Becherzelle (10400 x).
- Abb. 52: Zöliakie, Kryptenepithel, spärlicher Mikrovillusbesatz, (10400 x).
- Abb. 53: Normale Mukosa, absorptive Zellschicht, Zellextrusion* (7800 x).
- Abb. 54: Zöliakie, absorptive Zellschicht, Zellulzeration*, degradiertter Mikrovillussaum (7800 x).
- Abb. 55: Zöliakie, absorptive Zellschicht, degradiertter Bürstensaum mit verplumpten Mikrovilli (26000 x).
- Abb. 56: Zöliakie, absorptive Zellschicht, dichter Bürstensaum, apikale Zellzone homogen (26000 x).
- Abb. 57: Zöliakie, absorptive Zellschicht, Bürstensaum mit einstrahlenden Fibrillen (*) (36000 x).



Reguläre Bürstensäume waren allgemein an das Vorkommen einer partikelarmen und ca. 1 μm breiten Zone basal des Mikrovillus-saumes gebunden. Diese Zone entspricht in Lokalisation und Ausdehnung dem Terminal web der Dünnschnittelektronenmikroskopie (64, 58, 133).

Diese Zone erschien unter dichten Bürstensäumen homogen, zum Teil waren aus den Mikrovilli einstrahlende fibrilläre Strukturen deutlich erkennbar (Abb. 57). Dabei handelt es sich um die core-filamente der Mikrovilli (47, 48, 107, 109).

Parallel zur Verplumpung der MV, zu steigender Unregelmäßigkeit im Bürstensaum und zu abnehmender MV-Dichte bei Zöliakie erschien die oben beschriebene "apikale Zellzone" schmaler und weniger scharf nach basal abgrenzbar (Abb. 58). Runde bis ovale, ca. 100-200 nm große Partikel durchsetzten die Zone basal der Mikrovilli (Abb. 59). Die apikale Zellmembran erschien zwischen den Mikrovilli buchtig eingezogen.

Eine unklar abgegrenzte "apikale Zellzone", die mit vielen runden bis ovalen Partikeln durchsetzt war und eine buchtig eingezogene Zellmembran fand sich auch an unreifen Kryptenepithelzellen, sowohl der Zöliakiepatienten als auch der normalen Kontrollen (Abb. 60 und 61).

Abb. 58: Zöliakie, absorptive Zellschicht, degradiertes Bürstensaum, apikale Zellzone nicht erkennbar (7500 x).

Abb. 59: Zöliakie, absorptive Zellschicht, degradiertes Bürstensaum (25000 x).

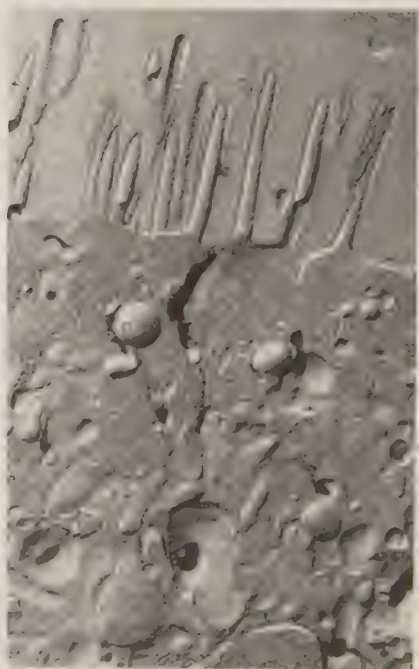
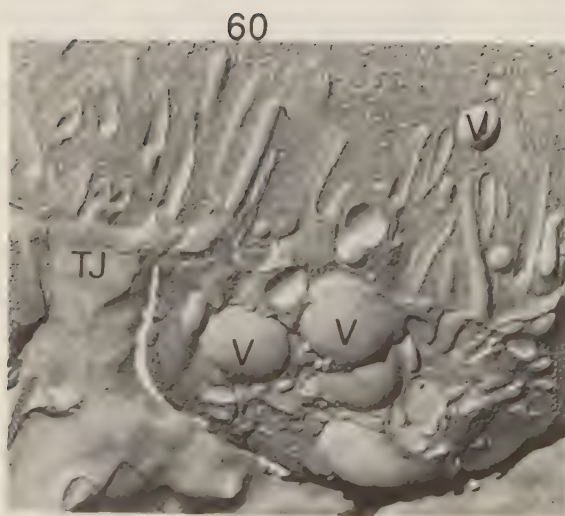
Abb. 60: Zöliakie, Kryptenepithel, Bürstensaum gering entwickelt, große Vesikel in apikaler Zellzone (29000 x).

Abb. 61: Normale Mukosa, Kryptenepithel, Bürstensaum gering differenziert, apikale Zellzone nicht abgrenzbar (24000 x).



58

61



Um die Mikrovillusdichte erfassen zu können, wurde in allen Negativen, die zur quantitativen Auswertung herangezogen worden waren, die Länge der Bruchlinie an der apikalen Zellmembran gemessen. Alle von dieser Bruchlinie an ihrer Basis getroffenen MV wurden gezählt. In jedem Bild wurde die maximal erfassbare Gewebebruchlänge gemessen. Unter der Annahme zufällig verlaufender Bruchlinien im Gewebe können vergleichbare Zahlen der MV-Häufigkeit je μm Bruchlänge erhalten werden.

Die Mikrovillushäufigkeit je μm Membranstrecke wurde für jedes erfasste Negativ einzeln berechnet. Die Mikrovillusdichte wurde durch die Zahl der $\text{MV}/\mu\text{m}^2$ ausgedrückt.

Die Zahl ausgewerteter Negative war bei Zöliakie in der Krypte 133, im Oberflächenepithel 161. In der Gruppe der "Normalen" wurden aus der Krypte 69, aus der Zotte 109 Bilder ausgewertet.

Die Quotienten aus jedem Negativ wurden, nach absorbierendem Epithel und Kryptenepithel getrennt, für jeden Patienten einzeln aufgetragen. Abb. 62 zeigt die Ergebnisse aus der Gruppe der Zöliakiekranken, Abb. 63 die Ergebnisse aus der Kontrollgruppe.

Bei Zöliakie streuen die Werte für die Mikrovillushäufigkeit/ μm im Krypten- und im Oberflächenepithel über einen weiten Bereich. Jedesmal wurde die größte MV-Häufigkeit im Oberflächenepithel gefunden, die geringste im Kryptenepithel. Nur wenige Werte des Oberflächenepithels liegen höher als die höchsten Werte des Kryptenepithels, die vermutlich aus dem obersten Drittel der Krypte stammen. Viele MV-Häufigkeiten aus dem absorbierenden Epithel liegen unter $4 \text{ MV}/\mu\text{m}$, bis hinab zu Werten von $1,4\text{--}2 \text{ MV}/\mu\text{m}$.

Bei jedem Patienten liegen die Werte des Oberflächenepithels durchschnittlich höher als die Werte aus der Kryptenzone.

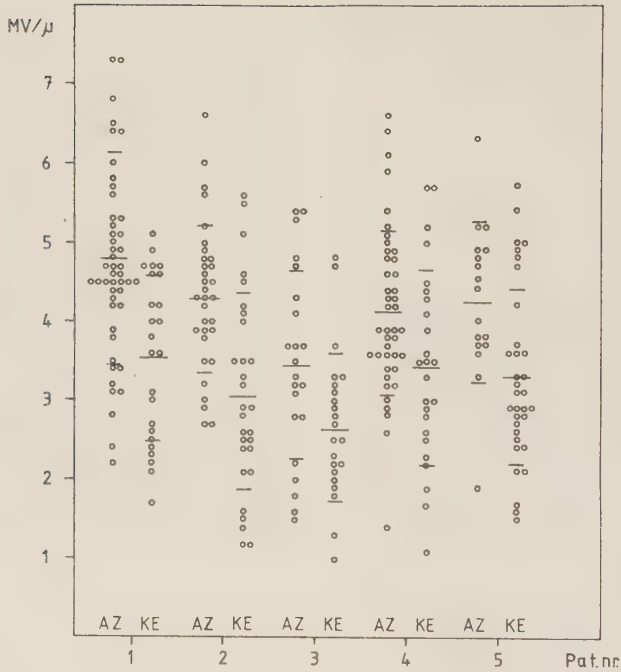


Abb. 62: Mikrovillushäufigkeit MV/μm, Zöliakie.

Insgesamt zeigt sich damit keine scharfe Trennung beider Zellzonen nach ihrer MV-Dichte. Zwar besitzt die absorbierende Zellschicht deutlich höher liegend MV-Dichten und eine geringere Schwankung ihrer Einzelwerte, jedoch nur wenige Stellen mit sehr dichtem MV-Saum. Dafür finden sich häufig Zelloberflächen mit sehr geringer Mikrovillusdichte.

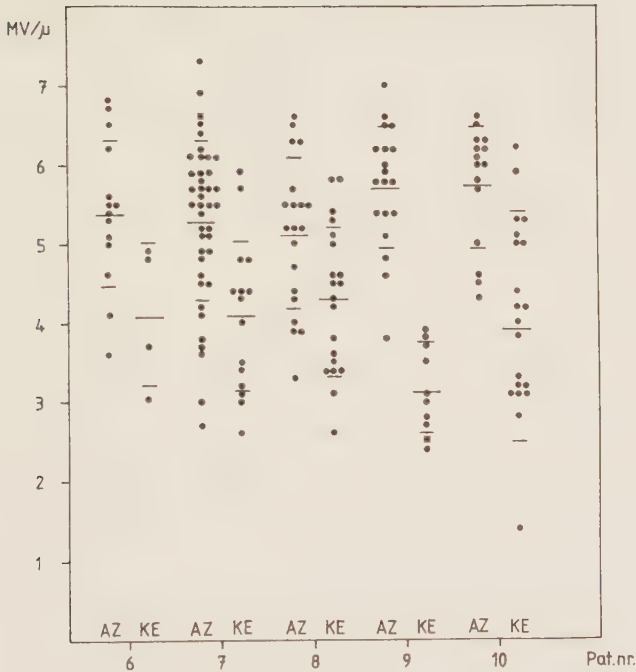


Abb. 63: Mikrovillushäufigkeit MV/um, Kontrolle.

In der Kontrollgruppe liegt die Mikrovillushäufigkeit insgesamt in den Krypten und Zotten höher. Die Einzelwerte aus Krypte und Zotte erscheinen deutlicher getrennt. Wieder stammt der niedrigste Wert stets aus der Kryptenregion des Patienten, der höchste aus der Zottenschicht. Allerdings liegen hier die Mittelwerte der Zotten deutlich höher als die Kryptenwerte.

In beiden Patientengruppen liegen die größten MV-Häufigkeiten der Krypten bei etwa 6 MV/μm; die Zahl der MV/μm im absorbierenden

Epithel erreicht fast den Wert $7,3 \text{ MV}/\mu\text{m}$ (entsprechend einer maximalen Mikrovillusdichte von $53,3 \text{ MV}/\mu\text{m}^2$).

Die Berechnung der durchschnittlichen MV-Häufigkeiten je $1 \mu\text{m}$ Membranstrecke ergab folgende Ergebnisse:

Tabelle 24: Mittlere MV-Häufigkeit ($\text{MV}/\mu\text{m}$)

	Zöliakie	Kontrollen
Absorptives Epithel	$4,29 \pm 1,20$	$5,42 \pm 0,93$
Kryptenepithel	$3,22 \pm 1,15$	$4,01 \pm 1,03$

Daraus ergibt sich ein Anstieg der MV-Häufigkeit von der Krypte zur Zotte hin um $35,2 \%$ (Kontrollen) bzw. $33,2 \%$ (Zöliakie). Bei den Kontrollen und bei Zöliakie kommt es zu einer Verschiebung des Histogramms aus dem Oberflächenepithel gegenüber dem aus der Krypte nach rechts. Dieser Effekt ist jedoch in der Kontrollgruppe deutlicher.

Wie in den Abb. 64 und 65 zu erkennen ist, werden die Werte einheitlicher: der Variationskoeffizient sinkt von $35,6 \%$ auf $27,9 \%$ (Zöliakie) bzw. von $26,3 \%$ auf $17,2 \%$ (Kontrollen).

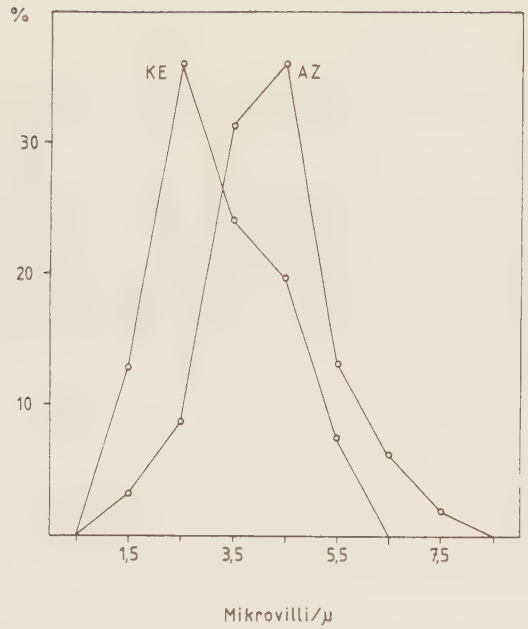


Abb. 64: Mikrovillushäufigkeit in absorptiver Zellschicht und Kryptenepithel, Zöliakie.

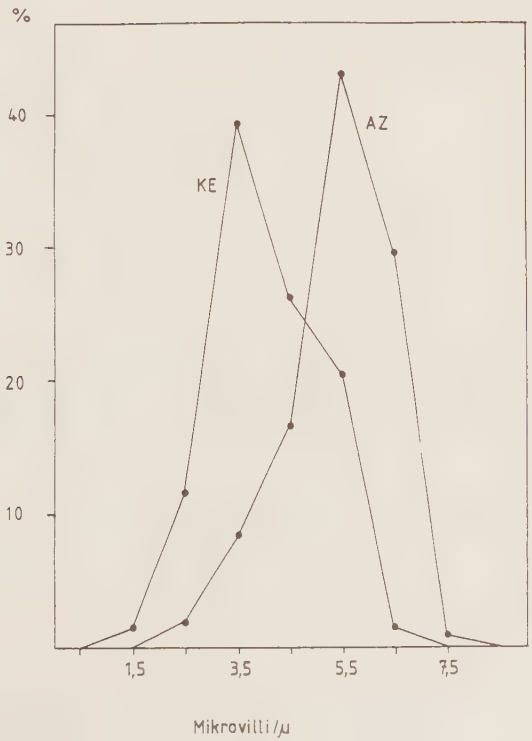


Abb. 65: Mikrovillushäufigkeit in absorptiver Zellschicht und Kryptenepithel, Kontrolle.

Das Defizit der Zöliakie in der MV-Häufigkeit steigt von 0,79 MV/ μ m in der Krypte (- 19,7 %) auf 1,13 MV/ μ m (- 20,9 %).

Beim Vergleich der MV-Häufigkeit zwischen Zöliakie und Kontrollen in beiden Zellebenen fällt jeweils das deutlich zu höheren Werten hin verschobene Polygon der Kontrollen auf. Die Differenz ist jedoch im absorptiven Bereich höher als in der Kryptenzone (Abb. 66 und 67). Die Polygonpaare weisen jeweils die gleiche Form auf.

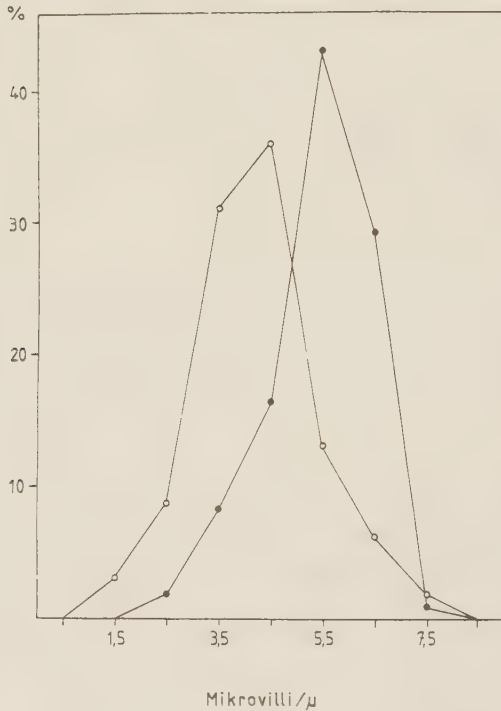


Abb. 66: Mikrovillushäufigkeit der absorptiven Zellschicht.
 o = Zöliakie ● = Kontrolle

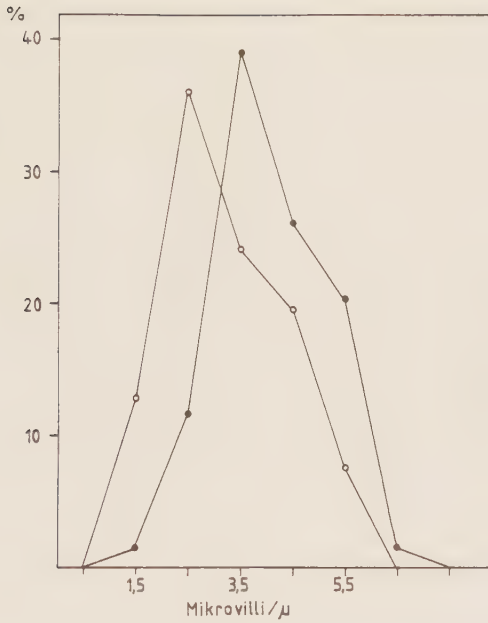


Abb. 67: Mikrovillushäufigkeit des Kryptenepithels.

o = Zöliakie

● = Kontrolle

Es zeigt sich, daß in beiden Gruppen im Oberflächenepithel gleich hohe Absolutwerte der MV-Häufigkeit erreicht werden können (Abb. 68 und 69).

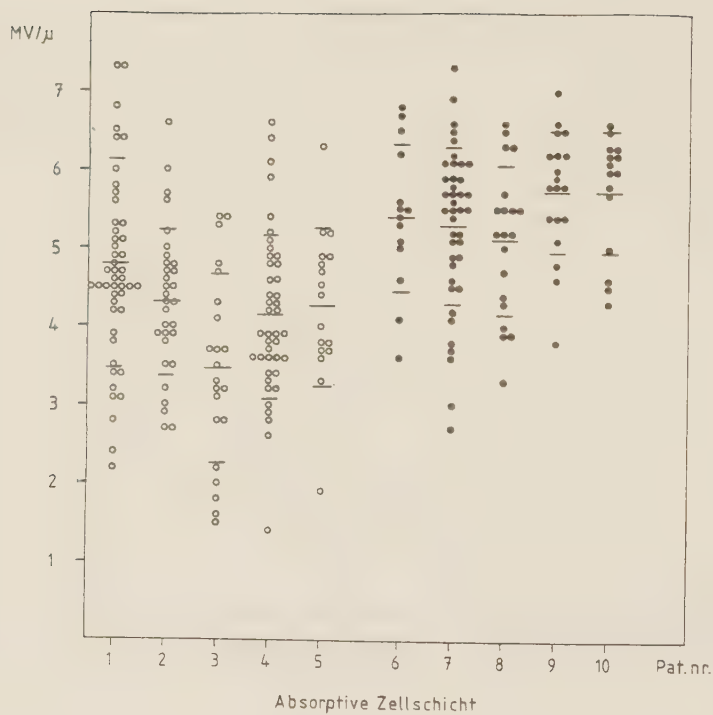


Abb. 68: Mikrovillushäufigkeit der absorptiven Zellschicht.

o = Zöliakie

● = Kontrolle

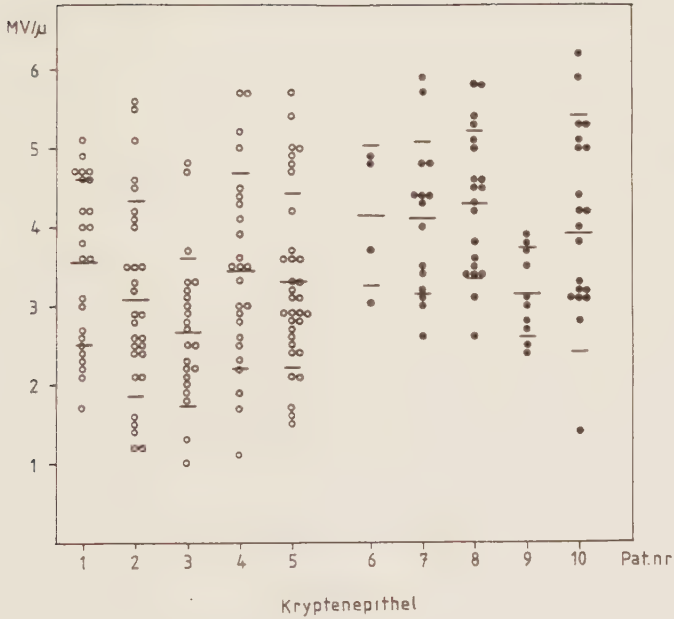


Abb. 69: Mikrovillushäufigkeit des Kryptenepithels.

o = Zöliakie

● = Kontrolle

Die Unterschiede zwischen den beiden Krypten- bzw. Oberflächenepithelwerten waren statistisch mit jeweils $p \leq 0,001$ signifikant.

Der Anstieg der Werte von der Krypte zum absorptiven Epithel hin, war ebenfalls in beiden Fällen mit $p \leq 0,001$ signifikant.

Umgerechnet auf die MV-Dichte der freien Membranfläche ergab sich:

Tabelle 25: Mittlere Mikrovillusdichte ($\text{MV}/\mu\text{m}^2$)

	Zöliakie	Kontrollen
Absorptives Epithel	18,4 (9,5-30,1)*	29,4 (20,2-40,3)
Kryptenepithel	10,4 (4,3-19,1)	16,1 (8,9-25,4)

* In Klammern ist jeweils der höchste und niedrigste Mittelwert angegeben.

Die MV-Dichte/ μm^2 ist in einem weiten Bereich variabel. Sie reicht von 1 $\text{MV}/\mu\text{m}^2$ (Krypte, Zöliakie) bis ca. 50 $\text{MV}/\mu\text{m}^2$ (Zotte, Kontrolle).

Der Besatz der freien Oberfläche mit MV nimmt im Zuge der Zellentwicklung bei Zöliakie um durchschnittlich 77 %, in der normalen Mukosa um 83 % zu.

Die graphische Darstellung zeigt Abb. 70.

Daraus folgt für die Zöliakie ein Defizit von 5,7 $\text{MV}/\mu\text{m}^2$ (35,5 %) in der Krypte und von 11 $\text{MV}/\mu\text{m}^2$ (37,4 %) im absorptiven Epithel.

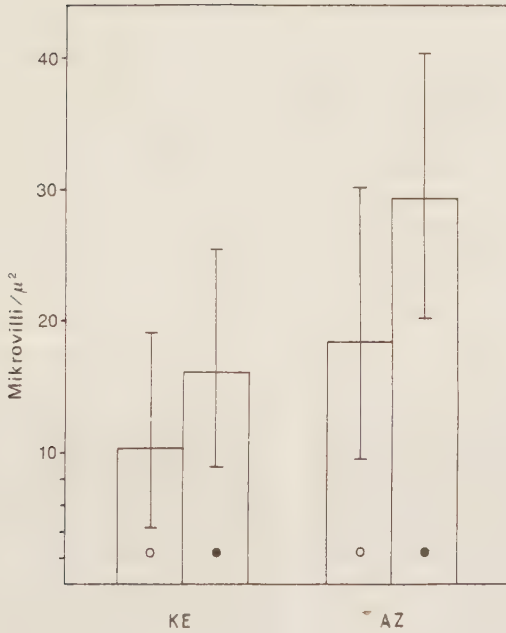


Abb. 70: Mikrovillusdichte der absorptiven Zellschicht und des Kryptenepithels.

o = Zöliakie

● = Kontrolle

Unter der Voraussetzung kontinuierlicher Zunahme der MV-Dichte als Zeichen zunehmender Zellentwicklung gibt der Anteil an Bürstensäumen der absorptiven Schicht mit niedrigerer MV-Dichte als denen der höchsten Kryptenwerte eine Vorstellung vom Anteil degenerierter und geschädigter Zellen im Oberflächenepithel.

Dieser erscheint bei Zöliakie stark vermehrt; nur bei wenigen absorptiven Epithelzellen übersteigt die MV-Dichte die höchsten Kryptenwerte (Abb. 62).

4.4.5 ABNORME MIKROVILLI

In dünnsschnittelektronenmikroskopischen Arbeiten wird bei der Zöliakie von einer Vermehrung gebüschelter MV in der oberen Kryptenzone (145) und von gehäuft auftretenden abnormen Mikrovilli im Oberflächenepithel berichtet (133).

Als abnorme MV werden im folgenden alle verzweigten oder deformierten Mikrovilli oder Mikrovillusbüschel bezeichnet (Abb. 71 und 72).

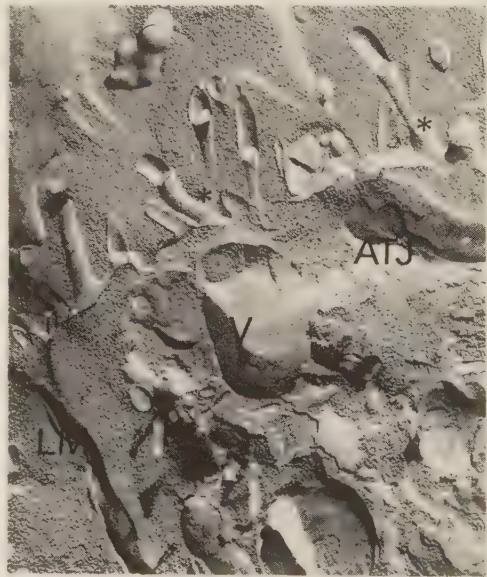


Abb. 71: Zöliakie, absorptive Zellschicht, verzweigte Mikrovilli (*) (44500 x).

Abb. 72: Zöliakie, Kryptenepithel, verzweigte Mikrovilli (*) (21000 x).

Gezählt wurden jeweils alle erkennbaren MV-Äste der MV-Büschel. Die Häufigkeit der abnormen Mikrovilli wurde auf die Gesamtzahl aller MV (regulär und abnorm) bezogen und in Prozent ausgedrückt.

Tabelle 26: Gesamtzahl erfasster Mikrovilli

	Zöliakie	Kontrollen
Absorptives Epithel	4290	4122
Kryptenepithel	2542	1936

Tabelle 27: Abnorme Mikrovilli in % aller Mikrovilli

	Zöliakie	Kontrollen
Absorptives Epithel	6,88 %	1,58 %
Kryptenepithel	4,68 %	3,51 %

In normaler Mukosa nimmt der Anteil abnormer Mikrovilli von der Krypte zur Zotte um 55 % ab, während sich bei Zöliakie der Anteil abnormer MV in der absorptiven Zellschicht gegenüber der Krypte noch erhöht (+ 47 %). Statistisch sind diese Veränderungen mit $p \leq 0,001$ signifikant.

Vergleicht man die Kryptenepithelzellen bei Zöliakie mit denen Normaler, so läßt sich statistisch kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit abnormer Mikrovilli feststellen.

Die Werte aus der absorbierenden Zellschicht sind jedoch mit $p \leq 0,001$ signifikant unterschiedlich: unter den MV der Zöliakiepatienten findet man über viermal soviele abnorme MV wie unter denen "gesunder" Patienten.

Unter den abnormen MV bei Zöliakie befanden sich vor allem gebälte oder gebüschelte MV-Formen. In der normalen Mukosa wurden hingegen vermehrt gebüschelte MV gefunden. Im Gegensatz zur Zöliakie wurden bei den Normalen in Zotten und Krypten keine deformierten Mikrovilli gesehen. Deformierte MV waren aber auch bei Zöliakie vergleichsweise selten.

Die Länge des Dünndarms beträgt beim Menschen etwa 250 cm, wobei ca. 25 cm auf das Duodenum, 125 cm auf das Jejunum und etwa 100 cm auf das Ileum entfallen. Auf lupen-, licht- und elektronenmikroskopischer Ebene sind 3 Arten von Strukturen zur Vergrößerung der Oberfläche erkennbar: Kerkring'sche Falten, Zotten und Mikrovilli. Dabei führen die Kerkring'schen Falten zu einer Vergrößerung der Oberfläche um den Faktor 3, die Zotten um den Faktor 10 und die Mikrovilli um etwa den Faktor 20. Somit wird die Fläche des Dünndarms auf etwa 200 m^2 vergrößert (187)(Abb. 73).

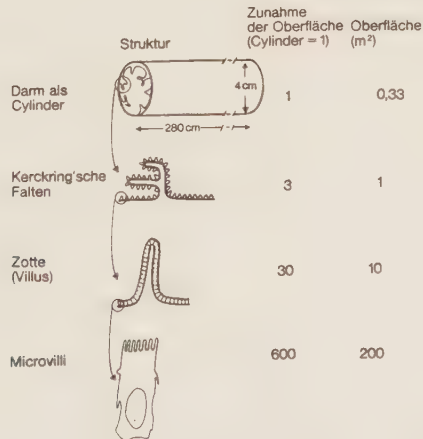


Abb. 73: Oberflächenvergrößernde Strukturen des Dünndarms (nach (187) aus R. F. Schmidt und G. Thews: Physiologie des Menschen, 19. Aufl. 1977, Springer Verlag Berlin, New York)

Die oben beschriebenen Veränderungen der Mikrovillusarchitektur und die Zottenatrophie der Mukosa müssen daher zur drastischen Reduktion der Resorptionsfläche führen (117, 118).

4.5.1

VERLUST AN RESORPTIONSFLÄCHE

Zur nachfolgenden quantitativen Berechnung des Verlustes an re-sorptionsfähiger Fläche (72) wird die Oberfläche eines Mikrovillus durch die eines Zylinders gleicher Länge und gleichen Durchmessers näherungsweise beschrieben. Der Verlust eines Mikrovillus führt damit zum Verlust der Mantelfläche dieses Zylinders.

Die durchschnittliche Mantelfläche eines "normalen Mikrovillus" (MV-Länge = $1,24 \mu\text{m}$; MV-Durchmesser = $0,103 \mu\text{m}$) beträgt $0,40 \mu\text{m}^2$, die eines MV bei Zöliakie (MV-Länge = $1,0 \mu\text{m}$; MV-Durchmesser = $0,107 \mu\text{m}$) beträgt $0,34 \mu\text{m}^2$. Bei einer MV-Dichte von $29,4 \text{ MV}/\mu\text{m}^2$ (Kontrolle) gegenüber $18,4 \text{ MV}/\mu\text{m}^2$ (Zöliakie) beträgt der Flächenzuwachs je μm^2 apikaler Membranfläche bei Normalen $11,8 \mu\text{m}^2$ und bei Zöliakie nur $6,25 \mu\text{m}^2$ auf insgesamt $12,8 \mu\text{m}^2$ (Normale) und $7,25 \mu\text{m}^2$ (Zöliakie).

Dies ergibt einen durchschnittlichen Flächenverlust von ca. 43 % bei Zöliakie nur aufgrund der veränderten MV-Architektur.

Bei einer durchschnittlichen Verkürzung der Zotten bei flacher Mukosa von $340 \mu\text{m}$ (eigene Messung) auf $60 \mu\text{m}$ (33, 179) und einer Verminderung der Zottendichte von durchschnittlich 19,05 auf 1,55 je mm^2 Muscularis mukosae (82) lässt sich der Verlust an Resorptionsfläche aufgrund des nahezu vollständigen Zottenverlustes - nach obiger Näherungsrechnung - abschätzen. Dazu seien die Zotten ebenfalls als Zylinder gedacht. Bei gleichem Durchmesser von $150 \mu\text{m}$ vergrößert sich die Mukosafläche bei Normalen auf $4,1 \text{ mm}^2$ je mm^2 Muskularis mukosae. Bei Zöliakie liegt nur eine Vergrößerung der Fläche auf $1,04 \text{ mm}^2$ vor. Daraus errechnet sich eine Flächeneinbuße von ca. 75 % gegenüber Normalen.

Bei unveränderter Vergrößerung der Oberfläche durch Kerkring'sche Falten um den Faktor 3 resultiert bei Zöliakie im Bereich flacher Mukosa eine Oberflächenvergrößerung der betroffenen Dünndarmfläche um $3 \times 1,04 \times 7,25 = 22,6$ und bei Gesunden um $3 \times 4,1 \times 12,8 = 157,4$.

Dies zeigt, daß es im betroffenen Dünndarmbereich - v.a. Duodenum und Jejunum - bei angenommen homogen flacher Mukosa zu einer Oberflächenreduktion um ca. 85 % kommt.

Bei alleiniger Schädigung von Duodenum und Jejunum unter vollständiger Schonung des Ileum wäre damit die gesamte Dünndarmfläche bei kindlicher Zöliakie auf etwa 40 % der normalen Fläche reduziert.

4.5.2 DEFIZIT AN INTRAMEMBRANPARTIKELN

Das Defizit an IMP im absorptiven Epithel beträgt bei Zöliakie auf der PF-Seite 29,2 % ($1037 \text{ IMP}/\mu\text{m}^2$) und auf der EF-Seite 37,1% ($504 \text{ IMP}/\mu\text{m}^2$). Zusammen mit der Flächenreduktion der flachen Mukosa von ca. 85 % (siehe 4.5.1) ergibt sich damit eine Verringerung der IMP der PF-Seite auf ca. 10 % der PF-IMP Normaler. Die Zahl der EF-IMP nimmt auf ca. 9 % der Zahl Normaler ab.

Unter der Bedingung des vollständigen Befalles von Duodenum und Jejunum und eines vollständig erhaltenen Ileums wäre somit die Gesamtausstattung des Dünndarms an IMP auf etwa 40 % des normalen Wertes herabgesetzt.

4.6 RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE

Zur rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung wurde - mit Ausnahme der Biopsien mit wiederhergestellter Mukosa nach glutenfreier Diät (4.6.3) - nur Biopsiematerial von Patienten verwendet, die in die quantitative Gefrierbruchuntersuchung eingeschlossen waren.

4.6.1 NORMALE KONTROLLEN

Bereits in niedriger Vergrößerung erkennt man die charak-

teristischen Strukturen der normalen Dünndarmmukosa: die finger- bis blattförmigen, schlanken Zotten mit samtig wirkender Oberfläche und unregelmäßigen, furchenartigen Einziehungen (Abb. 74, 75). An der Spitze der Zotten sind kleine, knopfartige Vorwölbungen zu finden (Abb. 74).

Bei hoher Vergrößerung sind die Grenzen der Epithelzellen als polygonale Einkerbungen der Bürstensäume zu erkennen. Auf der Mehrzahl der Zellen sind dichte Bürstensäume zu sehen (Abb. 76, 77). Besonders auf Zellen der Zottenseitenfläche erscheinen die Mikrovilli als regelmäßiger, dichter Besatz (Abb. 78). Die Dichte des MV-Besatzes kann, v.a. im Bereich der Zottenspitze, von Zelle zu Zelle deutlich wechseln (Abb. 79).

Becherzellen sind bei niedriger Vergrößerung als rundliche Einziehungen in Bürstensaum erkennbar (Abb. 78), bei hoher Vergrößerung sind vereinzelte Mikrovilli auf der ansonst glatt wirkenden apikalen Zelloberfläche feststellbar (Abb. 76).

4.6.2 FLORIDE ZÖLIAKIE

Bei niedriger Vergrößerung ist bei florider Zöliakie ein typischer Befund zu erheben. Die Zotten fehlen völlig und die Öffnungen der Krypten treten auf der flachen Mukosa deutlich hervor (Abb. 80). Aus der Kryptenmündung tritt fädig wirkendes Material (? Schleim) hervor.

Die Mukosaoberfläche zeigt häufig warzenartige Vorwölbungen, die besonders von den Krypten entfernt gehäuft aufzutreten scheinen.

Bei hoher Vergrößerung sind die Zellgrenzen weniger regelmäßig als bei Normalen. Der Mikrovillusbesatz der Zellen ist unregelmäßig, aufgelockert (Abb. 81), erscheint aber häufig auch dicht gepackt und regelmäßig (Abb. 82, 83).

Abb. 74: Normale Mukosa, finger- bis blattförmige Zotten (200 x).

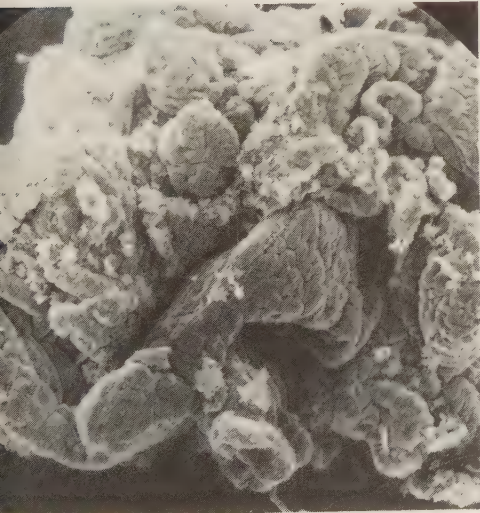
Abb. 75: Normale Mukosa, blattförmige Zotten (200 x).

Abb. 76: Normale Mukosa, Epithelzellen mit dichtem Bürstensaum, Becherzelle mit vereinzelt Mikrovilli (10800 x).

Abb. 77: Normale Mukosa, dichter Bürstensaum; Becherzelle (9700 x).

Abb. 78: Normale Mukosa, dichter Bürstensaum im Bereich der Zottenmitte (1100 x).

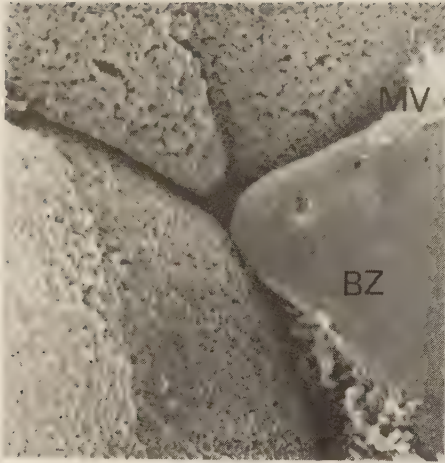
Abb. 79: Normale Mukosa, von Zelle zu Zelle deutlicher Wechsel der Mikrovillusdichte (7200 x).



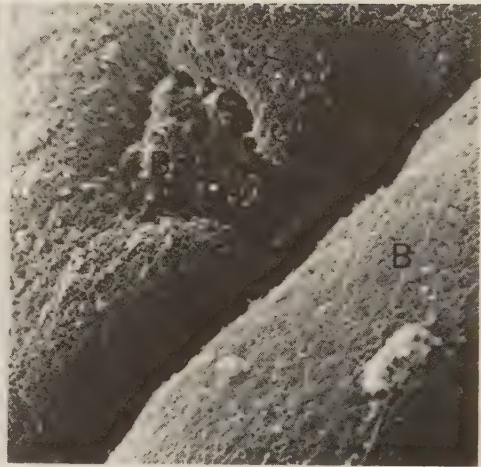
74

75





76



77



78



79

4.6.3 ZÖLIAKIE BEI GLUTENFREIER DIÄT

Unter glutenfreier Diät kommt es besonders bei kindlicher Zöliakie häufig zur völligen Wiederherstellung der Mukosaarchitektur.

Die Mukosa zeigt fingerförmige (Abb. 84) oder blattförmige (Abb. 85) Zotten mit furchenartigen Einkerbungen der glatt erscheinenden Oberfläche, häufig sichtbaren Becherzellen und warzenförmigen Abschnürungen der Zottenspitzen.

Bei höherer Vergrößerung sind dichte Bürstensäume mit regelmäßig angeordneten Mikrovilli zu sehen (Abb. 86). Die Zellgrenzen sind polygonal.

Zellen mit unregelmäßigen, aufgelockerten Bürstensäumen sind an der Zottenspitze zu erkennen. Dabei wechselt der Grad der Veränderung des Bürstensaumes von Zelle zu Zelle (Abb. 87). Hierbei dürfte es sich um degradierte Zellen der Extrusionszone handeln.

Insgesamt bietet die wiederaufgebaute Mukosa nach glutenfreier Diät ein Bild, das rasterelektronenmikroskopisch nicht von normaler Mukosa zu unterscheiden ist.

Abb. 80: Zöliakie, flache Mukosa, völliger Zottenschwund und sichtbare Kryptenöffnungen*(500 x).

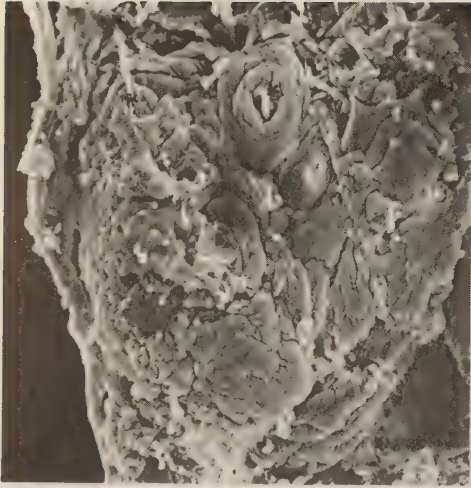
Abb. 81: Zöliakie, flache Mukosa, aufgelockerter Bürstensaum, unregelmäßige Zellgrenzen (12000 x).

Abb. 82: Zöliakie, flache Mukosa, dichter Bürstensaum (5400 x).

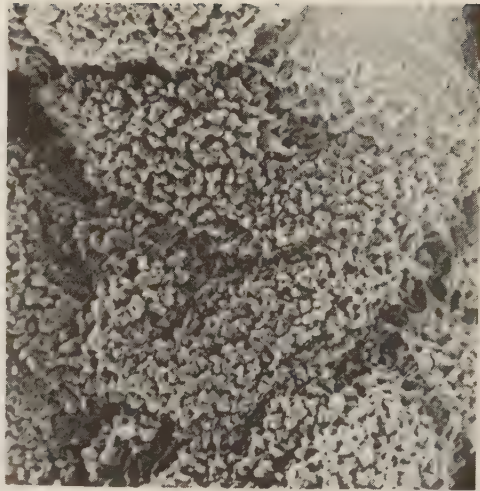
Abb. 83: Zöliakie, flache Mukosa, dichter Bürstensaum, Becherzelle mit wenigen Mikrovilli*(12000 x).

Abb. 84: Zöliakie, glutenfreie Diät, fingerförmige Zotten (250 x).

Abb. 85: Zöliakie, glutenfreie Diät, blattförmige Zotten (450 x).

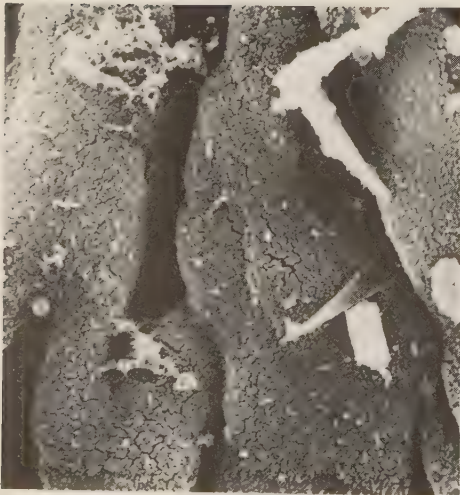


80



81

82



83

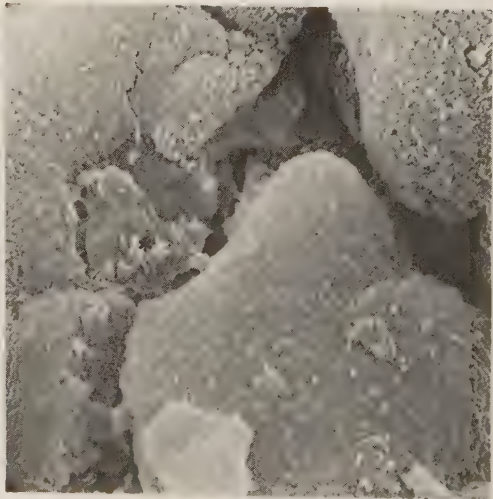
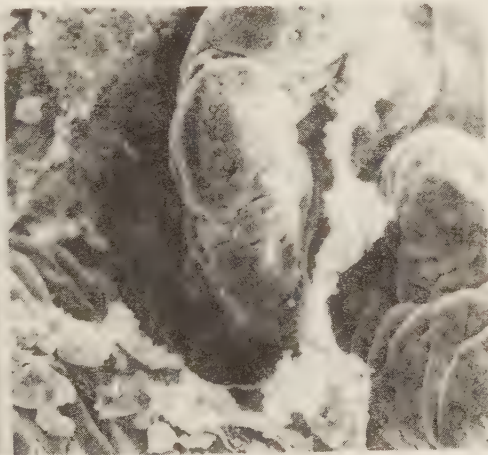
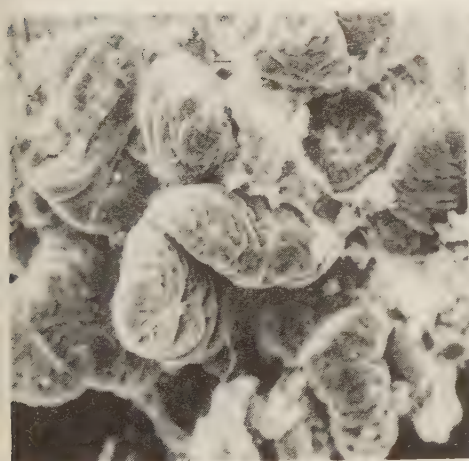


Abb. 86: Zöliakie, glutenfreie Diät, dichter Bürstensaum, regelmäßig polygonale Zellgrenzen (1500 x).

Abb. 87: Zöliakie, glutenfreie Diät, Zottenspitze: von Zelle zu Zelle stark wechselnde Bürstensaumdichte, Zellextension* (8000 x).

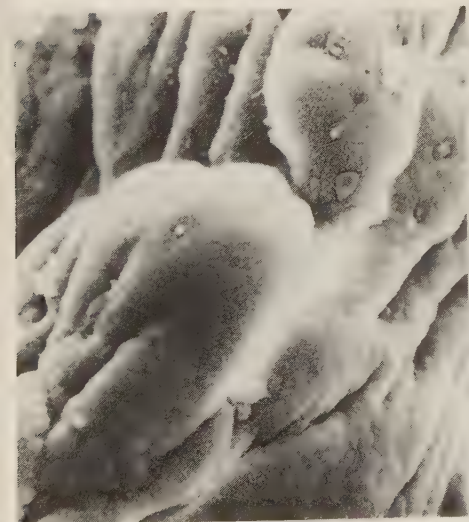
84

85



86

87



5. DISKUSSION

Hauptsächlich in den sechziger Jahren wurde eine große Zahl von dünnsschnittelektronenmikroskopischen Untersuchungen über die Ultrastruktur der Dünndarmepithelzelle durchgeführt (18, 23, 143, 146, 147). Gleichzeitig wurde auch die Veränderung der Ultrastruktur der Epithelzelle bei Zöliakie im Kindes- und Erwachsenenalter untersucht (3, 55, 65, 114, 119, 133, 149). Keine dieser Arbeiten lieferte jedoch quantitativ-morphometrische Ergebnisse über die Veränderungen an der Epithelzelle.

Veränderungen an Feinstrukturen der Zellmembran von Dünndarmepithelzellen (Tight junctions, Intramembranpartikel) bei Zöliakie im Erwachsenenalter untersuchten Madara und Trier 1980 (85, 87). Allerdings basiert diese Arbeit auf einer verhältnismäßig kleinen Zahl von Messungen.

Eine Untersuchung der Membranfeinstrukturen der Jejunumepithelzelle bei gesunden und zöliakiekranken Kindern lag bislang nicht vor.

Bei Zöliakie ist eine erhöhte Permeabilität des Dünndarmepithels für große Moleküle wiederholt festgestellt worden (14, 15, 31, 54, 101, 188). Da aus vergleichenden elektrophysiologisch-morphologischen Untersuchungen ein direkter Zusammenhang zwischen der Permeabilität eines Epithels und der Komplexität der TJ-Struktur (TJ-Tiefe, Anzahl der TJ-Elemente) bekannt ist (30, 83, 98), wäre demnach bei Zöliakie eine Veränderung der **TJ-Struktur** zu vermuten.

Im absorptiven Epithel wurde bei Zöliakie eine reduzierte TJ-Tiefe mit häufig stark verschmälerten TJ-Bändern gefunden. Dabei war die TJ-Tiefe im absorptiven Epithel ähnlich wie bei Madara und Trier (85) um ca. 20 % oder 50 nm vermindert. Insbesondere zeigte sich bei Zöliakie eine Abnahme der TJ-Tiefe gegenüber den

Werten des Kryptenepithels, während die durchschnittliche TJ-Tiefe bei Normalen nahezu gleich blieb.

Eine fast gleichsinnige Veränderung fand sich bei der Untersuchung der Zahl der TJ-Elemente. Dabei ist die Zahl der TJ-Elemente bei Zöliakie in der absorptiven Zellschicht vermindert. Die Zahl der TJ-Elemente im absorptiven Epithel verminderte sich bei Zöliakie gegenüber dem Kryptenepithel, bei gesunden Kindern nahm sie dagegen sogar noch etwas zu. Ähnlich dem Ergebnis in (85) wies die resorptive Oberfläche bei Zöliakie durchschnittlich ein um 1 TJ-Element verschmälertes TJ-Band auf (126).

Wie die TJ-Tiefe, ist auch die Zahl der TJ-Elemente der Krypten bei Zöliakie gegenüber den Krypten Gesunder vermehrt. Damit ergibt sich - wie bei den Messungen von Madara und Trier bei Erwachsenen - im absorbierenden Epithel eine Verschmälerung der TJ und eine Rarefizierung der TJ-Elemente gegenüber normalem Gewebe.

Da schon geringe Unterschiede in der Zahl der TJ-Elemente bzw. der TJ-Tiefe eine drastische Veränderung der Permeabilität des Epithels zu bewirken scheinen (30, 83, 126), ist eine nicht-lineare Zunahme der "versiegelnden" Wirkung bei Zunahme der TJ-Komplexität anzunehmen. Demnach wären schon die relativ geringen durchschnittlichen Veränderungen der TJ-Struktur bei Zöliakie für die erhöhte Permeabilität des Epithels bedeutungsvoll.

Diese Strukturveränderungen sind jedoch nicht homogen, sondern treten vielmehr streckenweise ("fleckig") auf. An den Zellen mit degradierter TJ (TJ-Tiefe 50-200 nm, ≤ 4 TJ-Elemente) finden sich somit TJ, wie sie von Claude und Goodenough (30) für sehr durchlässige Gewebe gefunden wurden.

Die von Madara beschriebenen lückigen TJ-Leisten, die er für die erhöhte Permeabilität des Gewebes verantwortlich macht, konnten beim Vergleich eigener komplementärer Replikas nicht gefunden werden. Nach Easter et al. (E2) müssen die "Lücken" der TJ-

Elemente ohnehin generell als Präparationsartefakte aufgefasst werden (154).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Madara und Trier waren die TJ des Kryptenepithels bei zöliakiekranken Kindern im Durchschnitt breiter und wiesen mehr TJ-Elemente auf. Dies mag darauf beruhen, daß aufgrund der elongierten Krypten bei Zöliakie bei der Trennung der Epithelzonen vermehrt untere, unreife Kryptenabschnitte zur Präparation gelangen, während bei den Normalen stets die gesamte Kryptenebene für den Gefrierbruch verwendet wurde. Da die Mitosen jeweils nur in der basalen Kryptenhälfte stattfinden (27, 37), könnten die gefundenen Unterschiede der TJ-Komplexität Ausdruck von TJ-Veränderungen durch die mitotische Aktivität der Kryptenepithelzellen sein.

Dies stünde in Übereinstimmung mit den von Tice et al. (167) gefundenen Veränderungen der TJ-Geometrie während der Mitose.

Die Zahl aberrierender TJ-Elemente, die in den Krypten bei Zöliakie stark vermehrt ist, korreliert ebenfalls mit der erhöhten Zellproliferation in den Krypten der flachen Mukosa.

Da die aberrierenden TJ in beiden Gruppen zum absorptiven Epithel hin abnehmen, scheint die Schädigung der Epithelzellen bei Zöliakie zwar mit einer morphologischen Degradation des apikalen TJ-Netzes einherzugehen, eine anarchische TJ-Bildung oder völlige Zerstörung der apikalen TJ-Barriere jedoch nicht hervorzurufen.

Ebenso wie das apikale TJ-Band wird auch die Triple-TJ im absorptiven Epithel bei Zöliakie verschmälert, während sie sich bei Normalen zwischen Zotte und Krypte nicht unterscheidet.

Die Bestimmung der TJ-Geometrie (TJ-Tiefe, Zahl der TJ-Elemente) wurde getrennt nach PF- und EF-Membranhälften vorgenommen. Dabei lagen sämtliche bestimmten Werte aus der PF-Seite der Membran niedriger als solche aus der EF-Seite. Dies schien im Widerspruch

zu der gesicherten Komplementarität des TJ-Gefrierbruchbildes (22, 28, 50, 108) zu stehen. Bei der Bestimmung des durchschnittlichen Abstandes zwischen zwei TJ-Elementen ergaben sich auf der PF- und EF-Seite jedoch nahezu identische Abstände in identischen Epithelzonen. Es muß deshalb gefolgert werden, daß bei einem Teil der Auswertungen der PF-Seite nicht die gesamte Breite der TJ erfasst werden konnte. Bei der schwierigen Abgrenzung gekörnt erscheinender TJ-Leisten gegen den IMP-besetzten Bürstensaum scheint eine genaue Erfassung der obersten TJ-Leiste häufig nicht möglich zu sein.

Bei der quantitativen Auswertung der TJ-Struktur sollte demnach allgemein die Bestimmung an der EF-Seite vorgenommen werden.

Bei der Bestimmung des mittleren Abstandes zwischen zwei TJ-Elementen ergab sich, daß bei Zöliakie und bei Gesunden in vergleichbaren Epithelzonen nahezu identische Abstände eingehalten werden. Dabei kommt es in beiden Kollektiven zu einer geringen Abnahme des mittleren Abstandes vom Kryptenepithel zum absorptiven Epithel. Diese Tendenz, sowie vergleichbare Absolutwerte lassen sich auch aus anderen Untersuchungen an menschlichen Epithelien (85, 86, 121, 126) entnehmen.

Diese bei Zöliakie erhaltene Konstanz in der TJ-Geometrie könnte eher gegen eine spezifische Störung der TJ-Bildung und für eine unspezifische Schädigung der TJ im Rahmen der Zellschädigung sprechen.

Übereinstimmend mit der Arbeit von Madara fanden sich die **Intramembranpartikel** auch bei kindlicher Zöliakie unsymmetrisch über beide Membranhälften verteilt. Die IMP-Dichte nahm jeweils von der Krypte zum absorptiven Epithel hin deutlich zu. Dabei dürften die Kryptenwerte Normaler wegen des höheren Anteils reiferer Zellen höher gelegen haben als bei Zöliakie.

Der Mangel an Partikeln im absorptiven Epithel stimmt mit dem von

Madara und Trier bei Erwachsenen gefundenen IMP-Mangel gut überein. Die gemessenen IMP-Dichten waren in den verschiedenen Epithelien den Werten aus Dünndarmgewebe Erwachsener gut vergleichbar.

Wenn auch die Biochemie der IMP nicht bekannt ist, so ist doch die Übereinstimmung der IMP-Dichte mit der Verteilung der Enzyme entlang der Krypten und Zotten (112) sowie dem Mangel an Enzymen in der flachen Mukosa bei Zöliakie (2, 12, 81, 114, 116, 132) auffällig.

Zudem besitzen z.B. die Mikrovilli von Becherzellen und möglicherweise Paneth'schen Körnerzellen wenige bzw. keine IMP, sodaß ein Zusammenhang der IMP mit der Zellart und -funktion sehr wahrscheinlich ist (78).

Im Bereich flacher Mukosa kommt es nach den experimentell ermittelten Zahlen zu einer Verminderung der IMP auf ca. 10 % der normalen Absolutmenge. Unter der Voraussetzung, daß es sich bei zumindest einem Teil der IMP um membranständige Enzyme handelt, wäre nach diesen Zahlen z.B. der klinisch bekannte Laktasemangel (16) verständlich.

Bislang existierte keinerlei quantitative Abschätzung der **Bürstensaumveränderungen** bei Zöliakie im Kindesalter. Die Angaben über die Morphologie des Bürstensaums stammen ausschließlich aus dünnschnittelektronenmikroskopischen Untersuchungen und geben jeweils nur Einzelmessungen wieder.

Entgegen früheren Untersuchungen (23, 65, 119, 135, 145, 148, 150) zeigen die Mikrovilli der absorptiven Zellschicht in der vorliegenden Arbeit nur eine geringe durchschnittliche Längenabnahme gegenüber den Mikrovilli des Kryptenepithels. Zwar bleibt damit der Mikrovillus bei Zöliakie im absorptiven Epithel kürzer und dicker als bei Normalen, das Ausmaß des durchschnittlichen Bürstensaumschadens ist jedoch nach den vorliegenden Ergebnissen

weit geringer als bisher allgemein angenommen.

Zugleich ergab sich in beiden Gruppen eine untere absolute Grenze des Mikrovillusdurchmessers bei ca. 80 nm. Demnach ist zur Ausbildung eines Mikrovillus eine Mindestdicke von ca. 80 nm erforderlich, während sich die Mikrovilluslänge variabel bis ca. 2,5 μm erstrecken kann.

Die in der Dünnschnittelektronenmikroskopie häufig als typisch für die flache Mukosa bezeichnete nahezu mikrovillusfreie Zelloberfläche erschien bei systematischer Untersuchung nur an wenigen, schwer geschädigten Epithelzellen. Es waren im Gegenteil bei der Mehrzahl der Zellen mäßig bis gut ausgebildete Bürstensäume erkennbar. Diese Beobachtung konnte mit rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen von flacher Mukosa bestätigt werden.

Auch zeigte sich von der Krypte zur absorptiven Zellschicht eine Zunahme der durchschnittlichen Mikrovillusdichte auf fast das Doppelte. Dennoch blieb die Mikrovillusdichte im absorptiven Epithel bei Zöliakie um fast 40 % unter der normaler Zotten.

An normalen Zotten wurde die durchschnittliche Mikrovillusdichte wesentlich niedriger bestimmt als bisher in der Literatur (33) angegeben. So lag die maximal beobachtete Mikrovillusdichte bei ca. 50/ μm^2 , während in der Literatur von MV-Dichten bis 100/ μm^2 berichtet wird.

Die Beobachtung, daß abnorme Mikrovilli im absorptiven Epithel bei Zöliakie vermehrt auftreten (133, 143) konnte dagegen bestätigt werden. Während diese bei Normalen von der Krypte zur Zotte hin deutlich abnehmen, treten abnorme Mikrovilli im Oberflächenepithel bei Zöliakie gegenüber den Krypten stark vermehrt auf.

Eine quantitative Abschätzung des Verlustes an Resorptionsfläche wurde unter Berücksichtigung der veränderten Mikrovillusmorphologie, der reduzierten MV-Dichte und des vollständigen Zottenver-

lustes durchgeführt. Dabei ergab sich gegenüber Gesunden eine Einbuße von ca. 85 % an resorptiver Oberfläche bei flacher Mukosa.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Zöliakie wurden charakteristische, wenn auch unspezifische ultrastrukturelle Veränderungen an den absorbierenden Dünndarmepithelzellen seit Einführung der Dünnschnittelektronenmikroskopie häufig beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurden Veränderungen an Feinstrukturen der Zellmembran von Jejunumepithelzellen bei Zöliakie im Kindesalter erstmals untersucht.

Im Mittelpunkt stand die Frage nach der Veränderung der Tight junction Struktur als mögliche Ursache erhöhter Permeabilität des Dünndarmepithels. Weiterhin wurden erstmals die Veränderungen des Bürstensaums der absorbierenden Jejunumzellen quantitativ beschrieben.

Dazu wurden Jejunumbiopsien von je 5 gesunden und 5 zöliakiekranken Kindern verwendet. Nach histologisch-morphometrischer Sicherung der Diagnose wurden die glutaraldehydfixierten Biopsien jeweils in absorptives Epithel und Kryptenepithel getrennt. Unter Verwendung der Gefrierbruchmethode wurden zahlreiche Zellmembranen von Epithelzellen dargestellt und die erhaltenen Pt/C-Replica elektronenmikroskopisch untersucht. An einer großen Zahl elektronenmikroskopischer Aufnahmen wurden Feinstrukturen der apikalen Zellmembran quantitativ-morphometrisch erfasst und die Ergebnisse statistisch ausgewertet.

Bei Zöliakie fand sich die TJ-Struktur im absorptiven Epithel verändert: die TJ-Tiefe war vermindert und die Zahl der TJ-Elemente reduziert. Die Schädigung der TJ-Struktur wechselte dabei von Zelle zu Zelle. Daraus ergab sich bei Zöliakie ein großer Anteil stark degenerierter TJ-Bereiche, wie sie für physiologischerweise sehr durchlässige Epithelien charakteristisch sind. Eine erhöhte Permeabilität des Oberflächenepithels

für große Moleküle ist damit zu vereinbaren.

Im Kryptenepithel unterschied sich die TJ-Struktur nur wenig. Die erhöhte Zahl abnormer TJ-Elemente und die gering vergrößerte TJ-Tiefe waren indirekte Parameter für die erhöhte Zellproliferation des Kryptengewebes bei Zöliakie.

Aus der Bestimmung des mittleren Abstandes zwischen 2 TJ-Elementen ergab sich eine große Konstanz des TJ-Aufbaus sowohl in gesundem als auch in erkranktem Gewebe. Daraus ließ sich eher auf eine unspezifische Schädigung der TJ im Rahmen der Zellschädigung des Oberflächenepithels als auf eine spezifische Störung der TJ bei Zöliakie schließen.

Vergleiche der Messergebnisse aus beiden Membranbruchhälften ergaben, daß allgemein bei der morphometrischen Erfassung der TJ-Geometrie die Auswertung des TJ-Bildes der EF-Membranhälfte zu bevorzugen ist.

Die Zahl der Intramembranpartikel - die häufig als das Gefrierbruchbild intramembraner Proteine und Lipoproteine gedeutet werden - war bei Zöliakie stark reduziert. Im Oberflächenepithel flacher Mukosa ist die Absolutmenge an IMP auf ca. 10 % der normalen Menge reduziert. Dies korreliert mit dem bekannten und klinisch relevanten Enzymmangel des Dünndarmepithels bei Zöliakie.

Überraschenderweise waren die durchschnittlichen Bürstensaumveränderungen weitaus weniger eindrucksvoll als bisher in der Literatur beschrieben. Die bisher oft als typisch beschriebene, fast mikrovillusfreie Zelloberfläche fand sich nur an wenigen, schwer geschädigten Zellen. Häufiger und damit typisch waren leicht- bis mittelgradig veränderte Bürstensäume mit deutlich verkürzten, verdickten und weniger dicht gepackten Mikrovillussäumen.

Trotz der relativ geringen durchschnittlichen Bürstensaumdegeneration der flachen Mukosa ergab sich bei Berechnung des Verlustes an resorptionsfähiger Fläche eine Einbuße von 85 % gegenüber normalem Jejunumepithel.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Anderson, C.M., Frazer, A.C., French, J.M.:
Coeliac disease: gastrointestinal studies and effect
of dietary wheat flour.
Lancet I (1952) 836-842

- 2 Andria, G., Cucchiara, S., de Vizia, B., de Ritis, G.,
Mazzacca, G., Auricchio, S.:
Brush border and cytosol peptidase activities of human
small intestine in normal subjects and celiac
patients.
Pediatr. Res. 14 (1980) 812-818

- 3 Araya, M., Walker-Smith, J.A.:
Specificity of ultrastructural changes of small
intestinal epithelium in early childhood.
Arch. Dis. Child. 50 (1975) 844-855

- 4 Ashkenazi, A., Levin, S., Miskin, A.:
Immunoglobulin levels in children with celiac disease:
variations with age and diet.
Israel. J. Med. Sci. 16 (1980) 843-846

- 5 Ashkenazi, A., Cooper, M., Nissim, F., Garti, R.,
Levin, S.:
Occurrence of celiac disease in children in a defined
area of Israel.
Israel. J. Med. Sci. 19 (1983) 63-66

- 6 Ashkenazi, A., Levin, S., Idar, D., Handzel, Z.T.,
Altman, Y., Or, A., Barzilar, N.:
Cellular immunity in children with coeliac disease.
Eur. J. Pediatr. 10 (1982) 1-4

- 7 Ashkenazi, A., Berrebi, A., Levi, R., Sakal, E.,
Idar, D.:
Frequency of HLA-B8 in Israeli children with celiac
disease.
Israel. J. Med. Sci. 15 (1979) 826-828
- 8 Ashkenazi, A., Idar, D., Handzel, Z.T., Ofarim, M.:
An in-vitro immunological assay for diagnosis of
coeliac disease.
Lancet I (1978) 627-629
- 9 Balcerzak, S.P., Lane, W.C., Bullard, J.W.:
Surface structure of intestinal epithelium.
Gastroenterology 58 (1970) 49-55
- 10 Balmer, F., Stucki, P., Pedrinis, E., Halter, F.:
Tumoren und eosinophile Granulome des Dünndarms bei
Malabsorption.
Schweiz. Med. Wschr. 104 (1974) 78-83
- 11 Barry, R.E., Read, A.E.:
Celiac disease and malignancy.
Quart. J. Med. 42 (1973) 665-673
- 12 Berg, N.O., Dahlqvist, A., Lindberg, T., Norden, A.:
Intestinal dipeptidases and disaccharidases in celiac
disease in adults.
Gastroenterology 59 (1970) 575-582
- 13 Bernstein, J., Burill, P., Kretchmer, N.:
Disaccharidase-deficient animals have normal
ultrastructure of intestinal brush border membranes.
Cell Tiss. Res. 220 (1981) 555-559
- 14 Bjarnason, I., Peters, T.J.:
A persistent defect in intestinal permeability in
coeliac disease demonstrated by a ⁵¹Cr-labelled EDTA
absorption test.
Lancet I (1983) 323-325

- 15 Bjarnarson, I., Peters, T.J.:
In vitro determination of small intestinal permeability: demonstration of a persistent defect in patients with celiac disease.
Gut 25 (1984) 145-150
- 16 Bockus, H.L.(Ed.):
Gastroenterology Vol. 2
3. Edition, 1976 W.B. Saunders Co. Philadelphia,
London, Toronto
- 17 Booth, C.C.:
The enterocyte in coeliac disease.
Br. Med. J. 4 (1970) 14-17
- 18 Booth, C.C.:
Enterocyte in coeliac disease-1.
Br. Med. J. 3 (1970) 725-731
- 19 Boshkov, S.P.:
Ultrastructural changes in the small intestinal mucosa in patients with primary malabsorption syndromes.
Z. gesamte Inn. Med. 36 (1981) Suppl. 204-206
- 20 Boyer, J.L.:
Tight junctions in normal and cholestatic liver: does the paracellular pathway have functional significance?
Hepatology 3 (1983) 614-617
- 21 Branton, D., Bullivant, S., Gilula, N.B., Karnovsky, M.J., Moor, H., Mühlethaler, K., Northcote, D.H., Packer, L., Satir, B., Satir, S., Speth, V., Staehelin, L.A., Steere, R.L., Weinstein, R.S.:
Freeze-etching nomenclature.
Science 190 (1975) 54-56
- 22 Branton, D.:
Fracture faces of frozen membranes.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 55 (1966) 1048-1056

- 23 Brown, A.L.:
Microvilli of the human jejunal epithelial cell.
J. Cell Biol. 12 (1962) 623-627
- 24 von Bülow, F., Moellgard, K., van Deurs, B.:
Tight junction structure in relation to
transepithelial resistance in the frog choroid plexus.
Eur. J. Cell Biol. 33 (1984) 90-94
- 25 Bullivant, S. in:
Sturgers, J.M. (Ed.): Electron microscopy III
9. Int. Congress on Electron Microscopy, Toronto
(1978) 659-672
- 26 Buschmann, R.J., Manke, D.J.:
Morphometric analysis of the membranes and organelles
of small intestinal enterocytes. I. Fasted hamster.
II. Lipid fed hamster.
J. Ultrastruct. Res. 76 (1981) 1-14, 15-26
- 27 Carchon, H., Bury, F., Kaczmarek, M., Eggermont, E.:
The intestinal brush border membrane.
Acta Gastro-Enter. Belg. 41 (1978) 28-31
- 28 Chalcroft, J.P., Bullivant, S.:
An interpretation of liver cell membrane and junction
structure based on observation of freeze-fracture
replicas of both sides of the fracture.
J. Cell Biol. 47 (1970) 49-60
- 29 Challacombe, D.N.:
Small-intestinal histology in coeliac disease.
Lancet I (1975) 1345-1346
- 30 Claude, P., Goodenough, D.A.:
Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and
"leaky" epithelia.
J. Cell Biol. 58 (1973) 390-400

- 31 Cobden, I., Dickinson, R.J., Rothwell, J., Axon, A.T.R.:
Intestinal permeability assessed by excretion ratios of two molecules: results in coeliac disease.
Br. Med. J. 2 (1978) 1060
- 32 Cornell, H.J., Rolles, C.J.:
Further evidence of a primary mucosal defect in coeliac disease. In vitro mucosal digestion studies in coeliac patients in remission, their relatives, and control subjects.
Gut 19 (1978) 253-259
- 33 David, H.:
Quantitative ultrastructural data of animal and human cells.
1. Aufl. 1977 Stuttgart, New York
- 34 van Deurs, B., Luft, J.H.:
Effects of glutaraldehyde fixation on the structure of tight junctions. A quantitative freeze-fracture analysis.
J. Ultrastruct. Res. 68 (1979) 160-172
- 35 van Deurs, B., Koehler, J.K.:
Tight junctions in the chorioid plexus epithelium. A freeze-fracture study including complementary replicas.
J. Cell Biol. 80 (1979) 662-673
- 36 Dicke, W.K., Weijers, H.A., van de Kramer, J.H.:
Coeliac disease. II. The presence in wheat of a factor having a deleterious effect in cases of coeliac disease.
Acta Paediat. Scand. 42 (1953) 34-42
- 37 Ditlmann, F.:
Morphometrische und proliferationskinetische Untersuchungen an kindlichen Dünndarmbiopsien bei Glutenenteropathie. Dissertation, München LMU 1977

- 38 Doherty, M., Barry, R.E.:
Gluten-induced mucosal changes in subjects without
overt small-bowel disease.
Lancet I (1981) 517-520
- 39 Dragsten, P.R., Blumenthal, R., Handler, J.S.:
Membrane asymmetry in epithelia: is the tight junction
a barrier to diffusion in the plasma membrane?
Nature 294 (1981) 718-722
- 40 Duffey, M.E., Hainau, B., Ho, S., Bentzel, C.J.:
Regulation of epithelial tight junction permeability
by cyclic AMP.
Nature 294 (1981) 451-453
- 41 Easter, D.W., Wade, J.B., Boyer, J.L.:
Structural integrity of hepatocyte tight junction.
J. Cell Biol. 96(3) (1983) 745-749
- 42 Edwards, H.H., Mueller, T.J., Morrison, M.:
Distribution of transmembrane polypeptides in freeze-
fracture.
Science 203 (1979) 1343-1346
- 43 Falchuk, Z.M., Katz, A.J.:
Organ culture model of gluten-sensitive enteropathy.
in: Mc Nicholl, B. (Ed.): *Perspectives in coeliac disease.*
MTP Press Ltd. London (1977) 65-73
- 44 Falchuk, Z.M.:
Update on gluten-sensitive enteropathy.
Am. J. Med. 67 (1979) 1085-1096
- 45 Friend, D.S., Gilula, N.B.:
Variations in tight and gap junctions in mammalian
tissues.
J. Cell Biol. 53 (1972) 758-776
- 46 Frömter, E., Diamond, J.:
Route of passive ion permeation in epithelia.

Nature New Biology 235 (1972) 9-13

- 47 Geiger, B., Dutton, A.H., Tokuyasu, K.T., Singer, S.J.:
Immunoelectron microscope studies of membrane-
microfilament interactions. Distribution of -Actinin,
Tropomyosin, and Vinculin in intestinal epithelial
brush border and chicken gizzard smooth muscle.
J. Cell Biol. 91 (1981) 614-628
- 48 Glenney, J.R., Bretscher, A., Weber, K.:
Calcium control of the intestinal microvillus
cytoskeleton.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77 (1980) 6458-6462
- 49 Glover, S.C., Brunt, P.W., Mills, C.F., Mowat, N.A.G.:
Zinc absorption and adult coeliac disease.
Gut 17 (1976) 813
- 50 Goodenough, D.A., Revel, J.P.:
A fine structural analysis of intercellular junctions
in the mouse liver.
J. Cell Biol. 45 (1970) 272-290
- 51 Griep, E.B., Dolan, W.J., Robbins, W.S., Sabatini,
D.D.:
Participation of plasma membrane proteins in the
formation of tight junctions by cultured epithelial
cells.
J. Cell Biol. 93 (1983) 693-702
- 52 Grüttner, R., Stern, M.:
Coeliakie - Klinik und Pathogenese.
Monatsschr. Kinderheilkd. 128 (1980) 109-117
- 53 Guix, M., Skinner, J.M., Whitehead, R.:
Measuring intraepithelial lymphocytes, surface area,
and volume of lamina propria in the jejunal mucosa of
coeliac patients.
Gut 20 (1979) 275-278

- 54 Hamilton, I., Cobden, I., Rothwell, J., Axon, A.T.R.:
Intestinal permeability in coeliac disease: the
response to gluten withdrawal and single-dose gluten
challenge.
Gut 23 (1982) 202-210
- 55 Hartman, R.S., Butterworth, C.E., Hartman, R.E.,
Crosby, W.H., Shirai, A.:
An electron microscopic investigation of the jejunal
epithelium in sprue.
Gastroenterology 38 (1960) 506-516
- 56 Henker, J.:
Die Zöliakie im Kindesalter. Teil II: Klinik,
Pathophysiologie, Diagnostik.
Z. ärztl. Fortbild. 75 (1981) 18-21
- 57 Henker, J.:
Die Zöliakie im Kindesalter. Teil III: Therapie,
Sonderformen, Komplikationen, Begleitkrankheiten.
Z. ärztl. Fortbild. 75 (1981) 54-56
- 58 Hirokawa, N.:
Quick freeze, deep etch visualization of the
cytoskeleton beneath surface differentiations of
intestinal epithelial cells.
J. Cell Biol. 91 (1981) 399-409
- 59 Hirokawa, N.:
The intramembrane structure of tight junctions: an
experimental analysis of the single-fibril and two-
fibril models using the quick-freeze method.
J. Ultrastruct. Res. 80 (1982) 288-301
- 60 Howdle, P.D., Corazza, G.R., Bullen, A.W.,
Losowsky, M.S.:
In vitro diagnosis of coeliac disease: an assessment.
Gut 22 (1981) 939-947

- 61 Howdle, P.D., Bullen, A.W., Losowsky, M.S.:
Cell-mediated immunity to gluten within the small
intestinal mucosa in coeliac disease.
Gut 23 (1982) 115-122
- 62 Hudson, D.A., Andersen, C.M.:
A new experimental system for the study of the
pathogenesis of coeliac disease.
Lancet I (1977) 511-512
- 63 Hull, B.E., Staehelin, L.A.:
Functional significance of the variations in the
geometrical organization of tight junction
networks.
J. Cell Biol. 68 (1976) 688-704
- 64 Hull, B.E., Staehelin, L.A.:
The terminal web. A reevaluation of its structure and
function.
J. Cell Biol. 81 (1979) 67-82
- 65 Iancu, T., Elian, E.:
The intestinal microvillus. Ultrastructural
variability in coeliac disease and cow's milk
intolerance.
Acta Paediatr. Scand. 65 (1976) 65-73
- 66 Jones, P.E., L'Hirondel, C.L., Peters, T.J.:
Protein synthesis by cultured jejunal mucosa from
control subjects and patients with coeliac disease.
Gut 22 (1981) 623-627
- 67 Jos, J., Labbe, F., Geny, B., Griscelli, C.:
Immunoelectron-microscopic localization of
immunoglobulin A and secretory component in jejunal
mucosa from children with coeliac disease.
Scand. J. Immunol. 9 (1979) 441-450
- 68 Juberthie-Jupeau, L.:
Cellular junctions of the midgut in the centipede

- (Scutigera Pagesi) as revealed by lanthanum tracer and freeze-fracture technique.
Tiss. Cell 11 (1979) 317-323
- 69 Kachar, B., da Silva, P.P.:
Rapid massive assembly of tight junction strands.
Science 213 (1981) 541-544
- 70 Kachar, B., Reese, T.S.:
Evidence for the lipidic nature of tight junction strands.
Nature 296 (1982) 464-466
- 71 Kachar, B., Reese, T.S.:
Membrane structure at tight junctions in quick frozen tissue.
J. Cell Biol. 91 (1981) 123a
- 72 Klish, J.W., Udall, J.N., Rodriguez, J.T., Singer, D.B., Nichols, B.L.:
Intestinal surface area in infants with acquired monosaccharide intolerance.
J. Pediatr. 92 (1978) 566-571
- 73 Kluge, F., Koch, H.K., Köttgen, E., Gerok, W.:
Glutensensitive Enteropathie - im Lichte neuer klinischer und pathogenetischer Befunde.
Klin. Wochenschr. 61 (1983) 669-679
- 74 Knutton, S., Limbrick, A.R., Robertson, J.D.:
Regular structures in membranes.
I. Membranes of the endocytic complex of ileal epithelial cells.
J. Cell Biol. 62 (1974) 679-694
- 75 Koehler, J.K. (Ed.):
Advanced techniques in biological electron microscopy II.
Springer Berlin, Heidelberg, New York 1. Aufl. 1978

- 76 Kreyszig, E.:
Statistische Methoden und ihre Anwendungen.
4. Aufl. 1973
Van den Hoeck und Rupprecht, Göttingen
- 77 de Laat, S.W., Tertoolen, L.G.J., Bluemink, J.G.:
Quantitative analysis of the numerical and lateral
distribution of intramembrane particles in freeze-
fractured biological membranes.
Eur. J. Cell. Biol. 23 (1981) 273-279
- 78 de Laat, S.W., Tertoolen, L.G.J., van der Saag, P.T.,
Bluemink, J.G.:
Quantitative analysis of modulations in numerical and
lateral distribution of intramembrane particles during
the cell cycle of neuroblastoma cells.
J. Cell Biol. 96 (1983) 1047-1055
- 79 Lebenthal, E., Branski, D.:
Childhood celiac disease - a reappraisal.
J. Pediatr. 98 (1981) 681-690
- 80 Löhrs, U.:
Morphologische und proliferationskinetische
Untersuchungen zur Epithelregeneration der
Darmschleimhaut unter experimentellen Bedingungen und
bei der menschlichen glutensensitiven Enteropathie.
Habilitationsschrift, München 1972
- 81 Lojda, Z.:
Cytochemistry of enterocytes and of other cells in the
mucous membrane of the small intestine.
Biomembranes 4A (1974) 43-122
- 82 Lorenz-Meyer, H., Ziegler, K., Böger, M., Adler, G.,
Rohde, H., Brandes, W.:
Quantitative Untersuchungen zur Struktur und Funktion
der Dünndarmschleimhaut an endoskopisch gewonnenem
Biopsiematerial.

Befunde von Patienten mit einheimischer Sprue, mit Zustand nach partieller Dünndarmresektion bei M. Crohn und mit Dünndarmresektion aus anderen Gründen.
Z. Gastroenterologie 18 (1980) 605-616

- 83 Madara, J.L.:
Increases in Guinea pig small intestinal transepithelial resistance induced by osmotic loads are accompanied by rapid alterations in absorptive cell tight junction structure.
J. Cell Biol. 97 (1983) 125-136
- 84 Madara, J.L., Neutra, M., Trier, J.S.:
Junctional complexes during morphogenesis of rat small intestine.
J. Cell Biol. 83 (1979) 395a
- 85 Madara, J.L., Trier, J.S.:
Structural abnormalities of jejunal epithelial cell membranes in celiac sprue.
Lab. Invest. 43 (1980) 254-261
- 86 Madara, J.L., Trier, J.S., Neutra, M.R.:
Structural changes in the plasma membrane accompanying differentiation of epithelial cells in human and monkey small intestine.
Gastroenterology 78 (1980) 963-975
- 87 Madara, J.L., Trier, J.S.:
Structure and permeability of goblet cell tight junction in rat small intestine.
J. Membrane Biol. 66 (1982) 145-157
- 88 Maffei, H.V.L., Kingston, D., Hill, E. D., Shiner, M.:
Histopathologic changes and the immune response within the jejunal mucosa in infants and children.
Pediatr. Res. 13 (1979) 733-736

- 89 Makita, T., Khalessi, A., Guttman, F.M., Sandborn, E.B.:
The ultrastructure of small bowel epithelium during freezing.
Cryobiology 8 (1971) 25-45
- 90 Malenkov, A.G., Melikyants, A.G.:
Ion permeability and strength of cell contacts. Ion permeability and mechanical properties of cell contacts in small intestine epithelium.
J. Membr. Biol. 36 (1977) 97-113
- 91 Mann, D.L., Katz, S.I., Nelson, D.L., Abelson, L.D., Strober, W.:
Specific B-cell antigens associated with gluten-sensitive enteropathy and dermatitis herpetiformis.
Lancet I (1976) 110-111
- 92 Manuel, P.D.:
Patchy enteropathy in childhood.
Gut 20 (1979) 211-215
- 93 Marsh, M.N., Brown, A.C., Swift, J.A.:
The surface ultrastructure of the small intestinal mucosa of normal control human subjects and of patients with untreated and treated coeliac disease using the scanning electron microscope.
in:
Coeliac disease
C.C. Booth and R.H. Dowling (Eds.)
Edinburgh and London, Churchill Livingstone 1970
26-43
- 94 Marsh, M.N., Peters, T.J., Brown, A.C.:
Observations of isolated enterocytes and of their subcellular components using transmission and scanning electron microscope.
Gut 12 (1971) 499-508

- 95 Marsh, M.N.:
The small intestine: mechanisms of local immunity and
gluten sensitivity.
Clin. Sci. 61 (1981) 497-503
- 96 Marsh, M.N., Swift, J.A.:
A study of the small intestinal mucosa using the
scanning electron microscope.
Gut 10 (1969) 940-949
- 97 Marsh, M.N., Swift, J.A., Williams, E.D.:
Studies of small intestinal mucosa with scanning
electron microscope.
Br. Med. J. 4 (1968) 95-96
- 98 Martinez-Palomo, A., Erlji, D.:
Structure of tight junctions in epithelia with
different permeability.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72 (1975) 4487-4491
- 99 McNeish, A.S., Harms, H.K., Rey, J., Shmerling, D.H.,
Visakorpi, J.K., Walker-Smith, J.A.:
The diagnosis of coeliac disease.
Arch. Dis. Child. 54 (1979) 783-786
- 100 McNicholl, B.:
Correspondence: Diagnosis of coeliac disease.
Arch. Dis. Child. 55 (1980) 575-577
- 101 Menzies, I.S., Laker, M.F., Pounder, R., Bull, J.,
Heyer, S., Wheeler, P.G., Creamer, B.:
Abnormal intestinal permeability to sugars in villous
atrophy.
Lancet II (1979) 1107-1109
- 102 Metz, J.:
Demonstration of experimental alterations of
intercellular junctions by freeze-fracture method.
Mikroskopie 34 (1978) 44-46

- 103 Meeuwisse, G.:
Diagnostic criteria in coeliac disease.
Acta Paediatr. Scand. 59 (1970) 461-463
- 104 Mörchen, R.:
Diabetes mellitus und Zöliakie
Med. Monatsschrift 30 (1976) 553-556
- 105 Moog, F.:
The lining of the small intestine.
Sci. Am. 245 (1981) 116-125
- 106 Moor, H.:
Freeze-etching
Int. Rev. Cytol. 25 (1969) 391-412
- 107 Mooseker, M.S., Graves, T.A., Wharton, K.A., Falco, N., Howe, C.L.:
Regulation of microvillus structure: calcium-dependent solation and cross-linking of actin filaments in the microvilli of intestinal epithelial cells.
J. Cell Biol. 87 (1980) 809-822
- 108 Mühlethaler, K.:
Studies on freeze-etching of cell membranes.
Int. Rev. Cytol. 31 (1971) 1-19
- 109 Mukherjee, T.M., Staehelin, L.A.:
The fine-structural organization of the brush border of intestinal epithelial cells.
J. Cell Sci. 8 (1971) 573-599
- 110 Neild, G.H.:
Coeliac disease: a graft-versus-host-like reaction localised to the small bowel wall?
Lancet I (1981) 811-812
- 111 Niedermeyer, W.:
Gefrierätzung.
Biologie in unserer Zeit 7 (1977) 178-187

- 112 Nordström, C., Dahlqvist, A.:
Quantitative distribution of some enzymes along the villi and crypts of human small intestine.
Scand. J. Gastroenterol. 8 (1973) 407-416
- 113 Nunez-Montiel, O., Bauza, C.A., Brunser, O., Sepulveda, H.:
Ultrastructural variations of the jejunum in the malabsorption syndrome.
Lab. Invest. 12 (1963) 16-24
- 114 Padykula, H.A., Strauss, E.W., Ladman, A.J., Gardner, F.H.:
A morphologic and histochemical analysis of the human jejunal epithelium in nontropical sprue.
Gastroenterology 40 (1961) 735-765
- 115 Pena, A.S., Mann, D.L., Hague, N.E., Heck, J.A., van Leuwen, A., van Rood, J.J., Strober, W.:
Genetic basis of gluten sensitive enteropathy.
Gastroenterology 75 (1978) 230-235
- 116 Peters, T.J., Jones, P.E., Jenkins, W.J., Nicolson, J.A.:
Analytical subcellular fractionation of jejunal biopsy specimen from control subjects and patients with coeliac disease.
in: Mc Nicholl, B. (Ed.): Perspectives in coeliac disease.
MTP Press Ltd. London (1977) 423-435
- 117 Phillips, A.D., Avigad, S., Sacks, J., Rice, S.J., France, N.E., Walker-Smith, J.A.:
Mikrovillous surface area in secondary disaccharidase deficiency.
Gut 21 (1980) 44-48
- 118 Phillips, A.D., France, N.E., Walker-Smith, J.A.:
The structure of the enterocyte in relation to its position on the villus in childhood: an electron

microscopical study.

Histopathology 3 (1979) 117-130

- 119 Phillips, A.D.:
Small intestinal mucosa in childhood in health and disease.
Scan. J. Gastroenterol. (Suppl.) 70 (1981) 65-85
- 120 Pitelka, D.R., Taggart, B.N.:
Mechanical tension induces lateral movement of intramembrane components of the tight junction. Studies on normal mammary cells in culture.
J. Cell Biol. 96 (1983) 606-612
- 121 Polak-Charcon, S., Shoham, J., Ben-Shaul, Y.:
Tight junctions in epithelial cells of human fetal hindgut, normal colon and colon adenocarcinoma.
JNCI 65 (1980) 53-62
- 122 Polak-Charcon, S., Ben-Shaul, Y.:
Degradation of tight junctions in HT 29, a human colon adenocarcinoma cell line.
J. Cell Sci. 35 (1979) 393-402
- 123 Pricam, C., Humbert, F., Perrelet, A., Orci, L.:
A freeze-etch study of the tight junction of the rat kidney tubules.
Lab. Invest. 30 (1974) 286-291
- 124 Pscheid, P., Plattner., H.:
Cryofixation of cell monolayers.
Proc. 7th Eur. Conf. Electron Microscopy
Den Haag 1980
- 125 Richards, F.M., Knowles, J.R.:
Glutaraldehyde as a protein crosslinking reagent.
J. Mol. Biol. 37 (1968) 231-237
- 126 Robenek, H.:
A quantitative freeze fracture analysis of gap and

- tight junctions in the normal and cholestatic human liver.
Virchows Arch. path. Anat. B 38 (1981) 39-56
- 127 Roesinger, B., Schiller, A., Taugner, R.:
A freeze fracture study of tight junctions in the pars convoluta and pars recta of the renal proximal tubule.
Cell Tiss. Res. 186 (1978) 121-133
- 128 Rolles, C.J., Kendall, M.J., Nutter, S., Anderson, C.M.:
One hour blood-xylose screening-test for coeliac disease.
Lancet ii (1973) 1043-1045
- 129 Rosekrans, P.C.M., Meijer, C.J.L.M., Polanco, I., Mearin, M.L., van der Wal, A.M., Lindeman, J.:
Long term morphological and immunohistochemical observations on biopsy specimens of small intestine from children with gluten sensitive enteropathy.
J. Clin. Pathol. 34 (1981) 138-144
- 130 Rotthauwe, H.W., Sennekamp, J., Emons, D., Becker, M.:
Antiretikulin-Antikörper und präcipitierende Antikörper gegen Nahrungsmittelproteine im Serum von Kindern mit Cöliakie.
Europ. J. Pediat. 121 (1976) 215-226
- 131 Rubin, C.E., Brandborg, L.L., Phelbs, P.C., Taylor, H.C.:
Studies of celiac disease. I. The apparent identical and specific nature of the duodenal and proximal jejunal lesion in celiac disease and idiopathic sprue.
Gastroenterology 38 (1960) 28-49
- 132 Rubin, W., Fauci, A.S., Sleisenger, M.H., Jeffries, G.H.:
Immunofluorescent studies in adult celiac disease.
J. Clin. Invest. 44 (1965) 475-485

- 133 Rubin, W., Ross, L.L., Sleisenger, M.H., Weser, E.:
An electron microscopic study of adult celiac disease.
Lab. Invest. 15 (1966) 1720-1747
- 134 Rusconi, R., Careddu, P.:
Mucous granules of the "goblet cells" in patients with
gluten intolerance. Electron microscopic study.
Min. Ped. 31 (1979) 1453-1457
- 135 Rusconi, R., Galluzzo, C., Roggero, P., Bianchi, C.:
Morphological and ultrastructural aspect of intestinal
mucosa in celiac disease.
Min. Ped. 30 (1978) 7-14
- 136 Rusconi, R., Roggero, P., Galluzzo, C., Careddu, P.:
Giunzioni laterali e spazi intercellulari.
Min. Ped. 31 (1979) 759-764
- 137 Scott, B.B., Losowsky, M.S.:
Patchiness and duodenal-jejunal variation of the mucosal
abnormality in coeliac disease and dermatitis
herpetiformis.
Gut 17 (1976) 984-992
- 138 Scott, H., Brandtzaeg, P.:
Enumeration of Paneth cells in coeliac disease:
comparison of conventional light microscopy and
immunofluorescence staining for lysozyme.
Gut 22 (1981) 812-816
- 139 Selby, W.S., Janossy, G., Jewell, D.P.:
Immunohistological characterization of intraepithelial
lymphocytes of the human gastrointestinal tract.
Gut 22 (1981) 169-176
- 140 Shearman, D.J.C., Finlayson, N.D.C.:
Diseases of the gastrointestinal tract and liver.
Churchill Livingstone Edinburgh, London, Melbourne, New
York 1982

- 141 Shiner, M.:
Duodenal biopsy.
Lancet I (1956) 17-19
- 142 Shiner, M.:
Ultrastructure of jejunal surface epithelium in
untreated idiopathic steatorrhoea.
Brit. Med. Bull. 23 (1967) 223-225
- 143 Shiner, M.:
Electron microscopy of jejunal mucosa.
Clin. Gastroenterol. 3 (1974) 33-53
- 144 Shiner, M., Shmerling, D.H.:
The pathogenesis of coeliac disease.
Gut 11 (1970) 1058-1059
- 145 Shiner, M., Birbeck, M.S.C.:
The microvilli of the small intestinal surface
epithelium in coeliac disease and in idiopathic
steatorrhoea.
Gut 2 (1961) 277-284
- 146 Shiner, M.:
A study of the ultrastructure of the human small
intestinal mucosal epithelium in health and in
idiopathic steatorrhoea.
Israel. J. Med. Sci. 4 (1968) 76-99
- 147 Shiner, M.:
Feinstrukturelle Untersuchungen am Zottenepithel des
menschlichen Dünndarms.
Internist 7 (1966) 217-223
- 148 Shiner, M.:
Ultrastructural features of allergic manifestations in
the small intestine of children.
Scand. J. Gastroenterol. Suppl. 70 16 (1981) 49-64

- 149 Shiner, M.:
Ultrastructural changes suggestive of immune reactions
in the jejunal mucosa of coeliac children following
gluten challenge.
Gut 14 (1973) 1-12
- 150 Shiner, M:
Ultrastructure of the small intestinal mucosa.
Normal and disease related appearances.
Springer Berlin, Heidelberg, New York 1983
- 151 Signer, E., Bürgin-Wolff, A., Berger, R., Birbaumer,
A., Just, M.:
Antibodies to gliadin as a screening test for coeliac
disease.
Helv. Paediat. Acta 34 (1979) 41-52
- 152 Signer, E.:
Die Zöliakie im Kindesalter.
Sandorama 4 (1979) 4-7
- 153 Silk, D.B.A., Kumar, P.J., Perret, D., Clark, M.L.,
Dawson, A.M.:
Amino acid and peptide absorption in patients with
coeliac disease and dermatitis herpetiformis.
Gut 15 (1974) 1-8
- 154 da Silva, P.P., Kachar, B.:
On tight junction structure.
Cell 28 (1982) 441-450
- 155 da Silva, P.P., Nicolson, G.L.:
Freeze-etch localization of concanavalin A receptors
to the membrane intercalated particles of human
erythrocyte ghost membranes.
BBA 363 (1974) 311-319
- 156 Simpson, F.G., Bullen, A.W., Robertson, D.A.F.,
Losowsky, M.S.:
HLA-B8 and cell-mediated immunity to gluten.

- Gut 22 (1981) 633-636
- 157 Singer, S.J., Nicolson, G.L.:
The fluid mosaic model of the structure of cell
membranes.
Science 175 (1972) 720-731
- 158 Sjöstrand, F.S.:
The interpretation of pictures of freeze-fractured
biological material.
J. Ultrastruct. Res. 69 (1979) 378-420
- 159 Smithson, K.W., Millar, D.B., Jacobs, L.R., Gray,
G.M.:
Intestinal diffusion barrier: unstirred water layer or
membrane surface mucous coat?
Science 214 (1981) 1241-1244
- 160 Staehelin, L.A., Hull, B.E.:
Junctions between living cells.
Sci. Am. 238 (1978) 140-152
- 161 Staehelin, L.A.:
Further observations on the fine structure of freeze-
cleaved tight junctions.
J. Cell Sci. 13 (1973) 763-786
- 162 Staehelin, L.A.:
Structure and function of intercellular junctions.
Int. Rev. Cytol. 39 (1974) 191-281
- 163 Stern, M., Dietrich, R., Müller, J.:
Small intestinal mucosa in coeliac disease and cow's
milk protein intolerance: morphometric and
immunofluorescent studies.
Eur. J. Pediatr. 139 (1982) 101-105
- 164 Stern, M., Dietrich, R.:
Gliadin- and immunoglobulin-containing cells of small
intestinal lamina propria in childhood coeliac

disease.

Eur. J. Pediatr. 139 (1982) 13-17

165 Strober, W.:

An immunological theory of gluten-sensitive enteropathy.

in: Mc Nicholl, B. (Ed.): Perspectives in coeliac disease
MTP Press Ltd. London (1977) 169-183

166 Talmon, A., Cohen, E., Bacher, A., Ben-Shaul, Y.:
Separation of induction and expression of tight
junction formation mediated by proteinases.
BBA 769 (1984) 505-507

167 Tice, L.W., Carter, R.C., Cahill, M.B.:
Changes in tight junctions of rat intestinal crypt
cells associated with changes in their mitotic
activity.
Tiss. Cell 11 (1979) 293-316

168 Tilney, L.G., Mooseker, M.S.:
Actin filament-membrane attachment: are membrane
particles involved?
J. Cell Biol. 71 (1976) 402-416

169 Toner, P.G., Carr, K.E.:
The use of scanning electron microscopy in the study
of the intestinal villi.
J. Path. 97 (1969) 611-617

170 Trier, J.S., Rubin, C.E.:
Electron microscopy of the small intestine: a review.
Gastroenterology 49 (1965) 574-603

171 Trier, J.S.:
Complications of celiac sprue and potentially related
diseases with similar intestinal histopathology.
Gastroenterology 75 (1978) 314-316

- 172 Trier, J.S.:
Studies on small intestinal crypt epithelium.
I. The fine structure of the crypt epithelium in the
proximal small intestine of fasting humans.
J. Cell Biol. 18 (1963) 599-620
- 173 Trier, J.S.:
Studies on small intestine crypt epithelium.
II. Evidence for and mechanisms of secretory activity
by undifferentiated crypt cells of the human small
intestine.
Gastroenterology 47 (1964) 480-495
- 174 Tulloh, E.A., Baylis, J.M., Challacombe, D.N.:
Automated analysis of morphological change in the
duodenal mucosa of children with coeliac disease.
Arch. Dis. Child. 56 (1981) 860-863
- 175 Unsworth, D.J., Manuel, P.D., Walker-Smith, J.A.,
Campbell, C.A., Johnson, G.D., Holborow, E.J.:
New immunofluorescent blood test for gluten
sensitivity.
Arch. Dis. Child. 56 (1981) 864-868
- 176 Vail, W.J., Papahadjopoulos, D., Moscarello, M.A.:
Interaction of a hydrophobic protein with liposomes.
Evidence for particles seen in freeze fracture as
being proteins.
BBA 345 (1974) 463-467
- 177 Varkonyi, T., Gergely, G., Varro, V.:
The ultrastructure of the small intestinal mucosa in
the developing human fetus.
Scand. J. Gastroenterol. 9 (1974) 495-500
- 178 Verkleij, A.J., Ververgaert, P.H.J.Th.:
The nature of the intramembranous particle.
Acta histochem. Suppl. XXIII (1981) 137-143

- 179 Vogel, A.:
Vergleichende Untersuchungen zur Morphologie der
Dünndarmschleimhaut bei verschiedenen Formen des
Malabsorptionssyndroms sowie bei anderen Erkrankungen
im Kindesalter.
Virchows Arch. Pathol. Anat. 352 (1971) 226-245
- 180 Wade, J.B., Karnovsky, M.J.:
The structure of the zonula occludens. A single fibril
model based on freeze-fracture.
J. Cell Biol. 60 (1974) 168-180
- 181 Walker, R.I., Porvaznik, M.J.:
Disruption of the permeability barrier (zonula
occludens) between intestinal epithelial cells by
lethal dosis of endotoxin.
Infect. Immun. 21 (1978) 655-658
- 182 Walker-Smith, J.A., Unsworth, D.J., Hutchins, P.,
Phillips, A.D., Holborow, E.J.:
Autoantibodies against gut epithelium in child with
small-intestinal enteropathy.
Lancet I (1982) 566-567
- 183 Wehrli, E., Mühlethaler, K., Moor, H.:
Membrane structure as seen with a double replica
method for freeze-fracturing.
Exptl. Cell Res. 59 (1970) 336-339
- 184 Weinstein, R.S., Merk, F.B., Alroy, J.:
The structure and function of intercellular junctions
in cancer.
Adv. Cancer Res. 23 (1976) 23-89
- 185 Welsch, U., Buchheim, W.:
Zelljunctionen
Verh. Anat. Ges. 72 (1978) 199-215
- 186 Wieser, H., Belitz, H.D., Ashkenazi, A., Idar, D.:
Isolation of coeliac active peptide fractions from

gliadin.

Z. Lebensm. Unters. Forsch. 176 (1983) 85-94

- 187 Wiseman, G.:
Absorption from the intestine.
Academic Press London, New York 1964
- 188 Wheeler, P.G., Menzies, I.J., Creamer, B.:
Effect of hyperosmolar stimuli and coeliac disease on
the permeability of the human gastrointestinal tract.
Clin. Sci. Mol. Med. 54 (1978) 495-501
- 189 Wright, N., Watson, A., Morley, A., Appleton, D.,
Marks, J.:
Cell kinetics in flat (avillous) mucosa of the human
small intestine.
Gut 14 (1973) 701-710
- 190 Yee, A.G., Revel, J.P.:
Endothelial cell junctions.
J. Cell Biol. 66 (1975) 200-204
- 191 Zamphigi, G., Corless, J.M., Robertson, J.D.:
On gap junction structure.
J. Cell Biol. 86 (1980) 190-198
- 192 Zingsheim, H.P., Plattner, H.:
Electron microscopic methods in membrane biology.
in: Korn, E.D.: Methods in membrane biology.
Vol. 7 (1976)
- 193 Zöliakiehandbuch
Hrsg.: Deutsche Zöliakiegesellschaft e.V.
Stuttgart 1979

Anhang **1**

Das folgende einfache Basicprogramm dient zur manuellen Elimination fehlerhafter Einzeldaten aus sequentiellen Dateien, wie sie mit dem A.S.M.-Bildanalyssystem gewonnen wurden. Der falsche Meßwert wird durch eine definierte Zahl überschrieben und bei der nachfolgenden Bearbeitung durch das Statistikprogramm (s.u.) eliminiert.

 K O R R E K T U R P R O G R A M M

```

10 CLEAR
20 DIM A$(1500)
30 PRINT CHR$(12);CHR$(30)
40 PRINT TAB(10);"WERTE VON HAND KORRIGIEREN"
50 PRINT
60 PRINT "GEBEN SIE DEN DATEINAMEN EIN"
70 INPUT DATEI$
80 REMOVE
90 MOUNT 1
100 OPEN DATEI$ AS 1
110 WHILE NOT EOF(1)
120 N=N+1
130 LINE INPUT 1, A$(N)
140 WEND
150 CLOSE
160 STOP
170 OPEN DATEI$ FOR OUTPUT AS 1
180 FOR C=1 TO N
190 PRINT 1,A$(C)
200 NEXT C
210 CLOSE
220 REMOVE
230 END

```

Anhang 2

Das nachfolgende Statistikprogramm bearbeitet die schrittweise Berechnung von Mittelwert, Standardabweichung und Varianz eines Parameters aus beliebig kombinierbaren sequentiellen Dateien von bis zu 4 Datendisketten.

```
*****
          S T A T I S T I K P R O G R A M M
*****

10 CLEAR
20 DIM Y(3000)
30 DIM DATEI$(15)
40 PRINT CHR$(12);CHR$(30)
50 REM DIESES PROGRAMM ERLAUBT DIE STATISTISCHE VERARBEITUNG
60 REM VON DATEN AUS SEQUENTIELLEN DATEIEN
70 REM DIE DATEN SIND DABEI IN ZWEIERBLOCKS ORGANISIERT
80 REM IM ERSTEN DATE WIRD EINE ERKENNUNGSSEQUENZ GESUCHT,
90 REM DIE IN LINE 670 ABGEFRAGT WIRD.
100 REM AUS DEM ZWEITEN, NACHFOLGENDEN DATE
110 REM WIRD DER MESSWERT ENTNOMMEN.
120 PRINT TAB(10);"STATISTIKPROGRAMM!"
130 PRINT:PRINT
140 PRINT
150 PRINT TAB(10);"MITTELWERT,STANDARDABWEICHUNG.....15
160 PRINT
170 PRINT TAB(10);"RECHNUNG UNTERDRÜCKEN.....20
180 PRINT
190 PRINT
200 PRINT"BITTE WÄHLEN SIE AUS !"
210 LINE INPUT ANTW$
220 IF ANTW$ <>"15" AND ANTW$ <>"20" THEN 120
```

```
230 IF ANTWS$ = "15" THEN 250
240 IF ANTWS$ = "20" THEN 1130
250 INPUT "WIEVIELE DATEIEN DIESER DISK SIND ZU BEARBEITEN?";X
260 PRINT
270 PRINT "GEBEN SIE BITTE DIE NAMEN DER DATEIEN EIN
280 FOR A = 1 TO X
290 INPUT DATEI$(A)
300 NEXT A
310 ON B GOTO 1040
320 PRINT
330 PRINT TAB(10)"WELCHE KOMPONENTE SOLL BEARBEITET WERDEN?
340 PRINT
350 PRINT" TJ-PF-TIEFE.....1
360 PRINT
370 PRINT" TJ-EF-TIEFE.....2
380 PRINT
390 PRINT" ZUSÄTZLICHE PARAMETER.....3
400 PRINT
410 PRINT" MV-LÄNGE.....4
420 PRINT
430 PRINT" MV-BREITE.....5
440 PRINT
450 PRINT" TRIPLE-TJ-LÄNGE.....6
460 PRINT
470 PRINT" BITTE WÄHLEN SIE
480 P$ = ".0000"
490 INPUT C$
500 X$ = C$+P$
510 PRINT X$
520 N = 1
530 FOR A = 1 TO X
540 LPRINT
550 PRINT CHR$(12);CHR$(30)
560 LPRINT "DATEI,KOMPONENTE
570 LPRINT DATEI$(A),C$
580 LPRINT
```

```

590 LPRINT
600 IF B1 = 1 OR B1 = 3 GOTO 1100
610 REMOVE
620 MOUNT 1
630 OPEN DATEI$(A) AS A
640 WHILE NOT EOF (A)
650 LINE INPUT A,A$
660 ON Q GOTO 710
670 B = INSTR(A$,X$)
680 IF B <> 6 THEN 760
690 Q = 1
700 GOTO 760
710 Y(N)=VAL(RIGHT$(A$,12))
720 Q = 0
730 IF Y(N) > 10000 GOTO 760
740 PRINT N
750 N = N+1
760 WEND
770 LPRINT N-1
780 NEXT
790 ON RU GOTO 960
800 LPRINT:LPRINT"WERT,MITTELWERT,VARIANZ,STANDARDABW.,DATENANZAHL
810 I = N-1
820 LPRINT
830 FOR O = 1 TO I
840 C=C + Y(O)
850 D=C/O
860 FOR N = 1 TO O
870 S = (Y(N)-D)2
880 A = A + S
890 NEXT N
900 IF O = 1 GOTO 920
910 S2 = A/(O-1)
920 S = 0: A = 0
930 X = SQR(S2)
940 LPRINT Y(O),D,S2,X,O

```

```
950 NEXT O
960 IF B1 = 4 GOTO 1120
970 B1 = B1 +1:IF RU = 0 GOTO 1000
980 INPUT "RECHNEN (1)EINGEBEN";RR
990 IF RR = 1 GOTO 800
1000 REMOVE
1010 INPUT "WIEVIEL DATEIEN AUF NÄCHSTER DISK BEARBEITEN?";X
1020 PRINT"BITTE NAMEN DER DATEIEN EINGEBEN"
1030 FOR A = 1 TO X
1040 INPUT DATEI$(A)
1050 NEXT A
1060 CLOSE
1070 REMOVE 1
1080 MOUNT 2
1090 GOTO 530
1100 OPEN "2:"+ DATEI$(A) AS A
1110 GOTO 640
1120 END
1130 RU = 1
1140 GOTO 250
```

LEBENS LAUF

Detlef Hermann Kohl, geboren am 5.6.1955 in Amberg als erstes Kind der Eheleute Bruno und Frieda Kohl.

Vier Jahre Grundschule in der Dreifaltigkeitsvolksschule in Amberg. 1965 Wechsel an das Gregor-Mendel-Gymnasium in Amberg. 1974 mathematisch-naturwissenschaftliches Abitur.

WS 1974/75 bis WS 1975/76 Studium der Chemie an der Universität Regensburg. WS 1976/77 bis WS 1978/79 Studium der Biologie an der Universität Regensburg. Vordiplom abgelegt im SS 1978.

Zum WS 1977/78 Immatrikulation an der medizinischen Fakultät der Universität Regensburg. Im September 1979 ärztliche Vorprüfung und anschließender Wechsel an die Technische Universität München.

1981 erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung.

1983 zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung.

1984 dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung an der TU München.

Approbation als Arzt im November 1984.

